



EFEITO DA EXPOSIÇÃO E ACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS E SALINIDADE EM ALFACE (*Lactuca sativa*)

Mariana Beirão da Cunha Lamas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Luísa Louro Martins

Co-orientador: Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor David Paulo Fangueiro, Investigador Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2012

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação, nomeadamente:

Aos meus orientadores, Professora Doutora Maria Luísa Louro Martins e Professor Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, por terem aceite a orientação deste trabalho, por tudo aquilo que me ensinaram, por toda a compreensão, atenção, disponibilidade, ajuda no tratamento estatístico e traduções.

À mestre Rafaela Reis por tudo aquilo que me ensinou no laboratório, nomeadamente nos métodos laboratoriais e por ter estado sempre disponível para me ajudar.

Ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, mais especificamente à Unidade de Investigação em Química Ambiental (UIQA) pela facilitação de meios e condições necessárias para a realização deste trabalho.

À Empresa Póvoa Semente pelo fornecimento das sementes de alface (*Lactuca sativa*, var. Blond Paris).

Ao senhor Felício pela ajuda durante o ensaio no Horto.

À minha colega Sandra e à Engenheira Maria Manuela Garrão pela ajuda que me deram.

À Filipa e à Inês, colegas da faculdade, por toda a ajuda e disponibilidade.

À Liliana por toda a ajuda que me deu no laboratório.

Às minhas colegas e amigas que me acompanharam ao longo do curso, principalmente à Joana, Filipa e Ana Sofia por todos os bons momentos, pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos Sara e Manuel por toda a amizade e boa disposição.

À minha melhor amiga Susana por ter estado sempre presente nos bons e maus momentos ao longo da minha vida, pelos fins-de-semana que passámos a escrever as nossas teses e pelo apoio que sempre me deu.

Ao meu namorado André por toda a sua boa disposição, amor, carinho e compreensão em todos os momentos.

Aos meus pais por me terem ajudado sempre ao longo da minha vida, por me terem dado a oportunidade de realizar este trabalho, por todo o apoio, carinho e paciência e por me terem levado ao ISA todos os fins-de-semana para regar as alfaces.

À minha irmã, por ser tão importante, pela amizade, por todas as risadas e bons momentos.

A toda a minha família por estarem sempre presentes na minha vida.

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se a resposta de plantas de alface (*Lactuca sativa*) ao stresse oxidativo induzido por elementos potencialmente tóxicos e pelo NaCl.

Nos ensaios de germinação e crescimento, aplicou-se separadamente Cd, As, Cu, Mn, Zn (0-500 μ M), NaCl (0-500 mM) e foi avaliada a taxa de germinação e o crescimento durante 2 semanas. A taxa de germinação foi afetada apenas pelo excesso de Cu, Zn e NaCl, a biomassa e índice de tolerância foram afetados pelas concentrações mais elevadas de todos os elementos aplicados.

Nos ensaios de rega, aplicou-se separadamente soluções contendo Cd, As, Cu e NaCl. Verificou-se uma sensibilidade elevada à salinidade, pois a aplicação de NaCl afetou negativamente o número de folhas, com redução significativa da biomassa e do teor de clorofila nas plantas contaminadas, apresentando alterações visuais e acumulação de Na na parte edível.

Foi verificada acumulação dos PTE na parte edível, atingindo valores superiores aos estabelecidos por lei para produtos hortícolas de folha, nomeadamente para o Cd e As, bem como alterações na composição dos restantes elementos minerais da planta. No entanto, nem sempre se verificaram alterações visuais pelo que a ingestão destas plantas pode constituir uma via de contaminação da cadeia alimentar.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*, stresse oxidativo, fitotoxicidade, elementos potencialmente tóxicos, salinidade.

ABSTRACT

In this work the response of lettuce (*Lactuca sativa*) to oxidative stress induced by potentially toxic elements (PTE) and NaCl was evaluated.

In the germination and growth assays Cd, As, Cu, Mn, Zn (0-500 μ M) and NaCl (0-500 mM) was applied separately for assessing the germination rate and growth for 2 weeks. The germination rate was affected only by Cu, Zn and NaCl. Biomass and tolerance index were affected at the higher concentrations of all PTE and NaCl.

In irrigation assays, solutions containing Cd, As, Cu and NaCl were applied separately. The number of leaves, biomass, dry matter content, chlorophyll content mineral composition were determined. The application of Cd and NaCl led to a decrease in the number of leaves and in all experiments there was a significant reduction in biomass and chlorophyll in contaminated plants. The application of NaCl led to an increase in dry matter content and the plants were visibly affected. There was accumulation of PTE and of Na in all the plants growing in the contaminated medium, exceeding legal limits for Cd and As, so their intake can be a hazard to human health.

Key-words: *Lactuca sativa*, oxidative stress, phytotoxicity, potentially toxic elements, salinity.

EXTENDED ABSTRACT

Contamination of soils, sediments and water with toxic chemicals is one of the major problems facing the industrialized world today. Potentially toxic elements (PTE) like heavy metals and metaloids, which can be included in the main category of pollutants, can be found in the soil, water and also in the atmosphere. However anthropogenic sources are the major cause of contamination of ecosystems, which includes the soil.

Soil salinity is one of the most important constraints that limit crop production in arid and semi arid regions. Seed germination is a critical stage in the life of plants and salt tolerance during germination is crucial for the establishment of plants that grow in saline soils.

The presence of large amounts of PTE and NaCl can also lead to changes in the mineral composition of plants, impoverishing them nutritionally.

Toxic levels of heavy metals induces an increase in intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), which can cause oxidative stress in plants. The main cellular components that are susceptible to damage by free radicals are proteins, DNA, carbohydrates, and lipids. ROS affects metabolic processes such as respiration, photosynthesis, CO₂ fixation among others.

Lettuce can accumulate Cd and As, and because leaves are consumed fresh, it may cause additional damage on human health.

In this work we evaluated the response of lettuce (*Lactuca sativa*) to induced stress by PTE and NaCl.

In germination and growth assays we applied separately Cd, As, Cu, Mn, Zn (in the concentrations of 0; 5; 10; 25; 50; 100; 150; 250; 350; 500 μ M) and NaCl (0; 5; 10; 25; 50; 100; 150; 250; 350; 500 mM) for assessing the germination rate and growth for 2 weeks. The germination rate was not affected in tests with Cd, As and Mn but was affected in tests with Cu, Zn and NaCl. As for biomass and tolerance index, significant differences in all assays were detected.

In irrigation assays, we applied separately solutions contaminated with Cd (50 μ M), As (50 μ M), Cu (100 μ M) and NaCl (25 mM). The number of leaves, biomass, dry matter content, chlorophyll content (Hansatech) and mineral elements concentration were determined for 42 days, in 7-day intervals. The application of Cd and NaCl led to a decrease in the number of leaves. The application of all PTE and NaCl negatively affected the biomass. The application of NaCl led to an increase in dry matter content. Chlorophyll content decreased in contaminated plants on all assays, showing that the application of PTE and NaCl affected the photosynthetic apparatus.

By assessing the mineral content, the addition of Cd appears to stimulate the absorption of other elements like Ca by the plant, and reduces the absorption of elements like Na, K, Mg, Zn, Mn,

Fe and Cu. The addition of As appears to stimulate the absorption of Na and Fe, and reduces the absorption of K, Mg, Ca, Zn and Mn. The addition of Cu appears to stimulate the absorption of Mn and reduces the absorption of Zn and Fe. The addition of NaCl appears to stimulate the absorption of Zn and Cu and reduces the absorption of Ca, Mg, Mn and Fe. This shows that probably there is a competition between the PTE/NaCl and these elements for their uptake at the root level or that the translocation to the leaves is being affected.

The lettuce plants had visible changes when exposed to NaCl, with growth and development visibly affected, with some leaves being withered. Generally this was not observed when exposed to PTE. The total content of Cd and As in plants detected was much higher than the maximum allowed by European regulations, unlike copper which is found within the limits imposed by the regulations in irrigation test with copper. So contaminated plants with most of PTE causes a concern in terms of food safety, because plants continue to grow and are apparently healthy, with no visible signs of contamination, and so they can be bought and ingested by consumers and can lead to toxic effect on humans.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
EXTENDED ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE QUADROS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1.OBJETIVOS	1
2. INTRODUÇÃO	2
2.1 Asteráceas	2
2.2 A alface	2
2.3 Stresse Oxidativo	4
2.4 Produção de ROS	4
2.5 Efeito do stresse oxidativo nas células	6
2.6 Mecanismos de defesa a ROS	7
2.7 Elementos potencialmente tóxicos (PTE)	10
2.7.1 Biodisponibilidade e acumulação de metais	12
2.7.2 Cádmio	14
2.7.3 Arsénio	17
2.7.4 Cobre	18
2.7.5 Manganês	20

2.7.6 Zinco	22
2.7.7 Salinidade	23
3. PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1 Plantas utilizadas	27
3.2 Ensaio de germinação e crescimento em meio contaminado	27
3.3 Ensaio de rega	28
3.4 Determinações analíticas	29
3.4.1 Ensaio de germinação e crescimento em meio contaminado	29
3.4.1.1 Determinação da taxa de germinação, biomassa e do índice de tolerância	29
3.4.2 Ensaio de rega	29
3.4.2.1 Determinação do teor de matéria seca	29
3.4.2.2 Determinação do conteúdo mineral	30
3.4.2.3 Determinação da clorofila pelo método não destrutivo- <i>Hansatech</i>	30
3.4.2.4 Determinação da correlação entre o teor de clorofila e o valor <i>Hansatech</i>	31
3.5 Tratamento estatístico	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Resultados do ensaio de germinação e crescimento	33
4.1.1 Taxa de germinação	33
4.1.2 Biomassa	35
4.1.3 Índice de tolerância	37
4.2 Resultados dos ensaios de rega	39
4.2.1 Germinação das sementes	39
4.2.2 Efeito dos PTE e do NaCl nas propriedades das plantas	40
4.2.2.1 Número de folhas	40

4.2.2.2 Biomassa.....	41
4.2.2.3 Teor de matéria seca.....	42
4.2.3 Efeitos dos PTE na clorofila	43
4.2.3.1 Curva de correlação entre o valor obtido pelo método <i>Hansatech</i> e o teor de clorofila medida no espectrofotômetro.....	43
4.2.3.2 Quantificação da clorofila- <i>Hansatech</i>	44
4.2.4 Análise dos elementos minerais.....	47
5. CONCLUSÕES	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss.	11
Figura 2 - Imagem do interior do microondas (CEM MDS 2000).	30
Figura 3 - Medição da clorofila pelo método não destrutivo com o aparelho <i>Hansatech</i>	31
Figura 4 - Zona de medições de clorofila numa folha de alface.	31
Figura 5 - Variação média da biomassa (g) das plântulas de alface sem contaminação e expostas a diferentes concentrações de Cd (a), As (b), Cu (c), Mn (d), Zn (e) e NaCl (f).	35
Figura 6 - Índice de tolerância das plântulas de alface para diferentes concentrações de PTE (Cd, As, Cu, Mn e Zn) (μM). (Análise estatística em anexo).....	37
Figura 7 - Índice de tolerância das plântulas de alface para diferentes concentrações de NaCl (mM).	38
Figura 8 - Germinação de plantas de alface em turfas.	39
Figura 9 - Número médio de folhas de alface em plantas controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 μM de Cd (a), 50 μM de As (b), 100 μM de Cu (c) e 25 mM de NaCl (d) durante 42 dias.	40
Figura 10 - Variação média da biomassa (g) de plantas controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 μM de Cd (a), 50 μM de As (b), 100 μM de Cu (c) e 25 mM de NaCl (d) durante 42 dias.	41
Figura 11 - Curva de correlação entre o valor obtido pelo método <i>Hansatech</i> e o teor de clorofila medido no espectrofotómetro. $y = 0,119x + 0,8531$; $R^2 = 0,9197$	44
Figura 12A -Teor médio de clorofila (unidades arbitrárias),na zona 1 e zona 2 das folhas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 μM Cd, 50 μM As, durante 42 dias.	45
Figura 12B - Teor médio de clorofila (unidades arbitrárias),na zona 1 e zona 2 das folhas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 100 μM Cu,25 mM NaCl, durante 42 dias..	46
Figura 13 - Acumulação na planta, ao longo do tempo, de cada um dos PTE aplicados e de NaCl: aplicação de Cd (a), aplicação de As (b), aplicação de Cu (c), aplicação de NaCl (d).	48

Figura A 1 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de Cd, ao fim de 2 semanas após a germinação.	71
Figura A 2 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de As, ao fim de 2 semanas após a germinação.	71
Figura A 3 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de Cu, ao fim de 2 semanas após a germinação.	72
Figura A 4 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de Mn, ao fim de 2 semanas após a germinação.	72
Figura A 5 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de Zn, ao fim de 2 semanas após a germinação.	73
Figura A 6 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de NaCl, ao fim de 2 semanas após a germinação.	73
Figura A 7 - Imagens de plantas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 μ M Cd recolhidas ao longo do ensaio.	76
Figura A 8 - Imagens de plantas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 μ M As recolhidas ao longo do ensaio.	79
Figura A 9 - Imagens de plantas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 100 μ M Cu recolhidas ao longo do ensaio.	82
Figura A 10 - Imagens de plantas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 25 mM NaCl recolhidas ao longo do ensaio.	85

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Composição média das folhas de alface. Valores expressos por 100 g de parte comestível (Adaptado de Almeida, 2006).....	3
Quadro 2 - Taxa de germinação de sementes de alface expostas a diferentes concentrações de PTE e NaCl.....	33
Quadro 3 - Teor de matéria seca (%) (MS (%)) de folhas de alface de plantas controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 µM de Cd, 50 µM de As, 100 µM de Cu e 25 mM de NaCl durante 42 dias.....	42
Quadro 4 - Teor de Cd (µg kg ⁻¹ MS); Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca (mg kg ⁻¹ MS), em folhas de alface de plantas controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 µM de Cd.	49
Quadro 5- Teor de As, Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca (mg kg ⁻¹ MS), em folhas de alface de plantas controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 µM de As.	52
Quadro 6 - Teor de Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca (mg kg ⁻¹ MS), em folhas de alface de plantas controlo e contaminadas por rega com solução contendo 100 µM de Cu.....	55
Quadro 7 - Teor de Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca (mg kg ⁻¹ MS), em folhas de alface de plantas controlo e contaminadas por rega com solução contendo 25 mM de NaCl.	57
Quadro A 1 - Índice de tolerância das plantas de alface para diferentes concentrações de PTE (Cd, As, Cu, Mn, Zn) (µM).	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AOX – Oxidase alternativa

APX – Ascorbato-peroxidase

ASC – Ascorbato ou ácido ascórbico

CAM – Metabolismo Ácido das Crassuláceas

CAT – Catalase

DHA – Desidroascorbato

DHAR – Desidroascorbato-redutase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GPX – Glutaciona-peroxidase

GR – Glutaciona-redutase

GSH – Glutaciona

GSSG – Glutaciona-oxidada

HNE – 4-hidroxi-2-nonenal

IAA-oxidase – Ácido indolacético-oxidase

MDA – Malondialdeído

MDAR – Malondialdeído-redutase

NADPH – Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

PSI – Fotossistema I

PSII – Fotossistema II

PTE – Elementos potencialmente tóxicos (*Potentially Toxic Elements*)

PUFA – Ácidos Gordos Polinsaturados (*Polyunsaturated fatty acid*)

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigénio (*Reactive oxygen species*)

SOD – Superóxido-dismutase

1.OBJETIVOS

Durante a sua vida as plantas estão sujeitas a condições de stresse oxidativo, o qual pode ser biótico (causado por outros seres vivos) ou abiótico (causado por metais pesados, excesso de sal, entre outros), ocorrendo um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e a atividade de remoção pelo sistema antioxidante naturalmente existente nos organismos. Nestas condições, pode verificar-se uma redução no seu crescimento, alterações na capacidade fotossintética, perda de compartimentação celular, aumento da permeabilidade a iões e solutos, entre outros.

A alface é uma das hortaliças folhosas economicamente mais importante no mundo, que contém poucas calorias, é rica em vitaminas A e C e também tem niacina, cálcio (Ca), fósforo (P), ferro (Fe) e fibras. Esta planta é acumuladora de cádmio (Cd) (Mendes & Oliveira, 2004) e propícia à acumulação de arsénio (As) (Bunzl *et al.*, 2001) e dado que as folhas são consumidas em fresco poderão causar um dano adicional na saúde humana.

Desta forma torna-se importante perceber o impacto que estes elementos assim como a salinidade extrema podem ter na produtividade das plantas, nomeadamente a problemática associada à potencial acumulação na parte edível e alterações a nível da germinação e crescimento da planta.

Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito de diversos elementos potencialmente tóxicos: Cd, As, cobre (Cu), manganês (Mn), zinco (Zn) e da salinidade, na forma de cloreto de sódio (NaCl) em plântulas de alface, nomeadamente o efeito na taxa de germinação e na biomassa. Posteriormente pretendeu-se analisar o efeito do Cd, As, Cu e NaCl no desenvolvimento da planta e a acumulação verificada nas folhas. Para isso avaliaram-se os efeitos visíveis da toxicidade em diversos parâmetros, como o número de folhas, biomassa, teor de matéria seca, teor de clorofila (*Hansatech*) e composição mineral.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Asteráceas

A família *Asteraceae* representa a maior família de dicotiledóneas e abrange aproximadamente 23 000 espécies que estão distribuídas por mais de 1500 géneros. As Asteráceas encontram-se principalmente nas regiões temperadas, sendo que algumas são utilizadas como produtos hortícolas, plantas aromáticas e medicinais. Grande parte das Asteráceas é cultivada devido às suas folhas comestíveis, muito embora em certos casos também se utilizem outros órgãos. Uma das principais culturas hortícolas desta família é a alface (Almeida, 2006).

2.2 A alface

A alface (*Lactuca sativa*) é uma planta herbácea anual, que pertence à família *Asteraceae* e é cultivada na região mediterrânica pelo menos desde 2500 a.C., pelas folhas comestíveis e no Egito Antigo pelo óleo extraído das sementes. Devido às exigências climáticas da alface, a sua produção em larga escala é feita apenas nas zonas temperadas do Hemisfério Norte, sendo os principais produtores mundiais, a China, os Estados Unidos e a União Europeia (Almeida, 2006).

O sistema radicular da alface é aprumado, pouco ramificado e relativamente superficial e a parte aérea é muito polimórfica. Ao longo da fase de crescimento vegetativo as folhas estão dispostas em roseta. Nos primeiros estados do desenvolvimento as folhas são alongadas e alargam-se quando se inicia a formação do repolho (Almeida, 2006). A alface pode apresentar folhas lisas ou crespas, existindo também alfaces com folhas roxas ou folhas bem recortadas.

A germinação ocorre entre 2 a 3 dias se a temperatura do substrato se encontrar entre os 20 e 25° C, mas se a temperatura for 15° C já será entre 4 a 6 dias. À temperatura de 5° C a planta também germina, embora as sementes levem mais de 2 semanas para germinar (Almeida, 2006).

Quanto às exigências climáticas, as temperaturas ótimas para a produção da maioria das cultivares de alface são entre os 15 e 20 °C, sendo que para temperaturas médias inferiores a 7 °C o crescimento é bastante reduzido e acima dos 24 °C há uma redução da qualidade da alface, pois os repolhos não estão firmes e os caules tendem a alongar-se. É uma cultura que suporta baixa luminosidade, que prefere solos frescos e bem drenados, sendo por isso exigente em água e apresenta sensibilidade à acidez, sendo o pH ótimo entre 6,5 e 7,2. Quando as técnicas culturais não são apropriadas ou os solos e águas se encontrarem poluídos, as alfaces podem acumular quantidades nocivas de nitratos e de metais pesados (Almeida, 2006).

Relativamente à colheita da alface, esta pode ser realizada em qualquer altura do desenvolvimento vegetativo, sendo dependente das exigências, preços de mercado e compromisso entre rendimento e qualidade. Tem que se ter em conta que uma colheita realizada muito cedo, pode levar a baixos rendimentos e uma colheita tardia afeta a qualidade, pois as folhas terão um sabor amargo e a planta pode espigar (Almeida, 2006).

A alface é perecível, apresenta taxas de respiração moderadas a elevadas e é sensível à perda de água e etileno, o qual acelera a senescência e leva a manchas acastanhadas, com consequências negativas na qualidade do produto. Depois de colhidas as alfaces devem ser rapidamente arrefecidas para 1-2 °C (Almeida, 2006).

As folhas de alface são geralmente consumidas cruas em saladas, e têm maioritariamente água na sua composição. Contudo, como se pode observar pelo quadro 1, contêm poucas calorias, são muito ricas em vitaminas A e C (ácido ascórbico) e também têm na sua composição niacina, Ca, P, Fe e fibras. A cor das folhas é bastante importante, uma vez que o valor nutritivo das alfaces varia em função desta. Assim sendo, as folhas esbranquiçadas do interior do repolho são menos nutritivas do que as folhas exteriores (Almeida, 2006).

A alface tem uma ação sedativa ou calmante, antiespasmódica e béquica, em grau moderado, devido às lactonas sesquiterpénicas (Almeida, 2006).

Quadro 1 - Composição média das folhas de alface. Valores expressos por 100 g de parte comestível (Adaptado de Almeida, 2006)

Macronutrientes	Teor nas folhas de alface	Vitaminas	Teor nas folhas de alface	Minerais	Teor nas folhas de alface
Água (%)	94-96	Vitamina A (UI)	502- 7405	Potássio (mg)	141-247
Energia (kcal)	13-18	Tiamina (mg)	0,04-0,07	Cálcio (mg)	18-36
Proteína (%)	0,8-1,6	Riboflavina (mg)	0,03-0,07	Fósforo (mg)	20-33
Gordura (%)	0,15-0,30	Niacina (mg)	0,12-0,38	Magnésio (mg)	7-13
Glúcidos (%)	2,1-3,5	Ácido ascórbico (mg)	3,0-24,0	Sódio (mg)	5-9
Fibra (%)	1,1-2,1	Vitamina B6 (mg)	0,04-0,09	Ferro (mg)	0,4-1,2

2.3 Stresse Oxidativo

Ao longo da sua vida as plantas estão sujeitas a condições desfavoráveis e que constituem fatores de stresse e afetam o desenvolvimento da planta. Ao conjunto de alterações fisiológicas, que resultam da ação direta ou indireta de ROS¹ e que afetam processos metabólicos, tais como a respiração, fotossíntese, fixação do CO₂ entre outros, dá-se o nome de stresse oxidativo (Vangronsveld & Clijsters, 1994).

O stresse pode ser biótico, causado por outros seres vivos, ou abiótico, decorrente de um excesso ou déficit no ambiente físico ou químico, tal como a seca, radiação ultravioleta, excesso de água ou luz, carência de nutrientes, toxicidade de metais pesados, elevada salinidade, tratamentos fitossanitários, entre outros (Apel & Hirt, 2004). Quando tal se verifica, ocorre um desequilíbrio entre a produção de ROS e a atividade de remoção pelos antioxidantes (Ahmad *et al.*, 2008). Geralmente verifica-se que a produção de ROS, bem como os danos induzidos por estas aumentam durante os stresses abiótico e biótico (Møller *et al.*, 2007).

No entanto, o aumento da produção intracelular de ROS desencadeia uma resposta metabólica na planta que se traduz na ativação de determinados mecanismos de eliminação do excesso de ROS no interior das células para que haja um controlo da acumulação destas espécies e da regulação da expressão genética (Martins & Mourato, 2008).

2.4 Produção de ROS

As ROS são subprodutos do metabolismo aeróbico das plantas, que resultam de variadas vias metabólicas (tais como a respiração celular, fotorrespiração, oxidação de lípidos e fotossíntese) localizadas em diversos compartimentos celulares, como as mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomas (Navrot *et al.*, 2007; Apel & Hirt, 2004; Møller, Jensen, & Hansson, 2007). Em alguns destes casos, as ROS são produzidas nas plantas como produtos principais das reações enzimáticas, como por exemplo, glicolato-oxidase nos peroxissomas durante a fotorrespiração. Noutros casos, a produção de ROS já parece ser um acidente inevitável, como por exemplo, a produção do radical superóxido (O₂^{•-}) pela cadeia transportadora de eletrões mitocondrial (Møller *et al.*, 2007). As ROS são conhecidas como produtos metabólicos tóxicos nas plantas e em outros organismos aeróbicos (Gechev *et al.*, 2006). A resposta da planta e dos seus componentes às ROS depende de diversos fatores, tais como do tipo de ROS em questão, da sua concentração, local de produção, do estado de desenvolvimento da planta, bem como da existência de stresses anteriores e da interação com outras

¹ Neste trabalho será utilizada a abreviatura ROS, resultante do inglês *Reactive Oxygen Species*, para referir espécies reativas de oxigénio.

moléculas de sinalização, como o óxido nítrico, mensageiros lipídicos e de hormonas das plantas (Gechev *et al.*, 2006).

Contudo, uma evidência crescente indica-nos que as ROS também funcionam como moléculas de sinalização nas plantas, que controlam processos como a morte celular programada, respostas ao stresse abiótico, defesa a patógenos e sinalização sistémica (Mittler, 2002). As ROS também podem ser produzidas para executar certas tarefas, como por exemplo, a produção de $O_2^{\bullet-}$ na superfície exterior da membrana plasmática pela NADPH-oxidase após o reconhecimento do patógeno, bem como noutros processos (Møller *et al.*, 2007). Por esta razão é muito importante que haja um controlo apertado da produção e remoção de ROS (Apel & Hirt, 2004). Este controlo nos níveis de ROS é da responsabilidade de uma rede elaborada composta por antioxidantes enzimáticos, antioxidantes e enzimas que produzem ROS (Gechev *et al.*, 2006). As plantas também ativam várias oxidases e peroxidases que produzem ROS em resposta a determinadas alterações ambientais (Apel & Hirt, 2004).

As plantas, sendo organismos aeróbios, utilizam o oxigénio molecular (O_2) como aceitador final de eletrões. Como resultado da redução do O_2 são produzidas espécies reativas de oxigénio (ROS), intermediários altamente reativos (Halliwell, 2006).

As ROS resultam da excitação do O_2 para formar singleto de oxigénio (1O_2), ou da transferência de um, dois ou três eletrões para o O_2 para formar o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou radical hidroxilo (HO^{\bullet}) respetivamente (Mittler, 2002). Algumas destas espécies são radicais, ou seja, têm um ou mais eletrões desemparelhados, como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (HO^{\bullet}), hidroperóxido (HO_2^{\bullet}), e outras são não radicais, tais como o singleto de oxigénio (1O_2) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Apel & Hirt, 2004). As ROS são capazes de oxidar sem restrições diversos componentes celulares e podem conduzir à destruição oxidativa da célula (Mittler, 2002). O H_2O_2 e o $O_2^{\bullet-}$ são espécies menos reativas e que se formam mesmo em condições metabólicas normais (Martins & Mourato, 2008). O HO^{\bullet} e o 1O_2 já são mais reativos e formam-se normalmente só em condições de stresse (Martins & Mourato, 2008).

O singleto de oxigénio (1O_2) é uma espécie reativa de oxigénio não radical produzida pela inversão do spin de um eletrão do oxigénio tripleto no estado fundamental (3O_2) e pode danificar outras moléculas, como por exemplo, causar a rápida peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados (Gechev *et al.*, 2006). O $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 têm elevada capacidade oxidante o que os torna muito perigosos para o ambiente celular envolvente. O H_2O_2 é uma molécula relativamente estável e dado o seu maior tempo de meia-vida, pode migrar dos locais de síntese subcelular para compartimentos adjacentes ou para células vizinhas. O $O_2^{\bullet-}$ pode inativar importantes enzimas metabólicas que contêm grupos Fe-S (ferro-enxofre) e alterar atividades catalíticas. O HO_2^{\bullet} encontra-se nomeadamente em ambientes celulares ácidos e pode atravessar membranas biológicas e iniciar a oxidação lipídica pela extração de prótons dos ácidos gordos polinsaturados (Gechev *et al.*, 2006).

As propriedades destrutivas do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 são mais elevadas quando interagem na presença de íons metálicos para formar o radical hidroxilo (HO^{\bullet}) altamente reativo durante a reação de Haber-Weiss (Gechev *et al.*, 2006). O HO^{\bullet} pode reagir e danificar virtualmente qualquer biomolécula com a qual entre em contacto (Mithofer *et al.*, 2004); sendo muito reativo, as células não possuem mecanismos enzimáticos para remover o HO^{\bullet} , contando por isso com mecanismos para prevenir a sua formação. Estes mecanismos englobam a eliminação precedente de $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 e/ou a sequestração dos íons metálicos que catalizam as reações de Haber-Weiss com proteínas de ligação a metais, como as ferritinas ou metalotioneínas (Gechev *et al.*, 2006).

2.5 Efeito do stresse oxidativo nas células

Em condições normais de crescimento a produção de ROS nas células é baixa, sendo os valores de concentração de $O_2^{\bullet-}$ próximos de $240 \mu M s^{-1}$ e tendo um nível estável de $0,5 \mu M$ de H_2O_2 nos cloroplastos. Contudo verifica-se uma alteração na homeostase celular devido a diversos stresses, tais como a seca, stresse salino, refrigeração, choque térmico, metais pesados, radiação ultravioleta, stresses mecânicos, carência de nutrientes, ataque por agentes patogénicos, stresse por excesso de luz e poluentes atmosféricos (Mittler, 2002). Os principais poluentes atmosféricos que originam modificações oxidativas a diversos componentes celulares, podendo induzir a morte celular programada são o ozono (O_3), o dióxido de enxofre (SO_2) e o dióxido de azoto (NO_2) (Møller *et al.*, 2007). Todos estes stresses aumentam a produção de ROS de $240-720 \mu M s^{-1}$ $O_2^{\bullet-}$ e de $0,5-15 \mu M$ de H_2O_2 (Mittler, 2002).

Os principais componentes celulares que são suscetíveis a danos pelos radicais livres são os lípidos, proteínas, DNA e glúcidos (Mithofer *et al.*, 2004). Para além da peroxidação lipídica desencadeada pelas ROS, também pode ocorrer a oxidação proteica que causa inibição enzimática ou outros danos na fração proteica e danos ao nível do DNA e RNA, levando à senescência, diminuição do processo de fotossíntese e necrose das folhas (Scandalios, 2002).

A peroxidação dos lípidos da membrana ocorre quando as ROS reagem com os ácidos gordos insaturados, causando perdas do conteúdo celular, dessecação rápida, logo a morte celular (Ahmad *et al.*, 2008). O efeito nocivo das ROS é devido sobretudo à sua capacidade para iniciar uma série de reações autoxidativas em cadeia nos ácidos gordos insaturados (Ahmad *et al.*, 2008). A peroxidação extensiva de PUFA leva a uma redução da fluidez da membrana, aumenta a permeabilidade e causa danos secundários às proteínas das membranas (Halliwell, 2006).

Com a peroxidação dos PUFA, sobretudo suscetíveis ao ataque pelo 1O_2 e HO^{\bullet} , formam-se muitos aldeídos, tais como 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e malondialdeído (MDA), bem como hidroxilo e ácidos gordos ceto (Møller *et al.*, 2007). O MDA é um produto da destruição das membranas

celulares por peroxidação de lípidos. Trata-se por isso de um aldeído utilizado como biomarcador do stresse oxidativo (Dixit *et al.*, 2001; Sandalio *et al.*, 2001).

O DNA pode sofrer alterações pelas ROS de diversas maneiras, sobretudo nas bases nucleotídicas. O HO• é o mais reativo, o $^1\text{O}_2$ ataca principalmente a guanina, e o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\bullet-}$ não reagem de forma alguma. A formação de 8-hidroxiguanina é a alteração geralmente mais observada. As ROS também podem modificar o DNA indiretamente. Um tipo comum de dano envolve a conjugação do MDA com a guanina, o que cria um anel extra (Møller *et al.*, 2007).

As ROS também causam modificações nos glúcidos. O HO• reage com glúcidos livres, como os açúcares e polióis. A oxidação de glúcidos com o HO• geralmente liberta ácido fórmico como principal produto de degradação (Møller *et al.*, 2007).

O ataque oxidativo nas proteínas resulta em modificações dos aminoácidos, fragmentação da cadeia peptídica, agregação dos produtos da reação ligados entre si e aumento da suscetibilidade à proteólise (Ahmad *et al.*, 2008). A proteólise pode ocorrer sob condições de stresse oxidativo, sendo uma maneira de adaptação das células às novas condições. As ROS vão oxidar as proteínas intracelulares, ou então estas vão ser degradadas por enzimas proteolíticas intracelulares. A atividade proteolítica pode aumentar devido à presença de certos metais tóxicos, como o Cd (Palma *et al.*, 2002).

2.6 Mecanismos de defesa a ROS

Muitas condições de stresse abiótico são acompanhadas por um aumento da taxa de produção de ROS e dos seus efeitos indesejáveis no metabolismo da planta. Assim sendo, evitar ou atenuar a produção de ROS poderá ser tão importante quanto os mecanismos ativos de remoção (Mittler, 2002).

A primeira linha de defesa contra o stresse oxidativo na planta é então evitar a produção de ROS (Gratão *et al.*, 2005). Os mecanismos que podem reduzir a produção de ROS durante o stresse são os seguintes:

1. Adaptações anatómicas, como por exemplo o movimento da folha e enrolamento, desenvolvimento de uma epiderme com propriedades de refletir a luz;
2. Adaptações fisiológicas, de determinadas espécies, como o metabolismo C_4 e CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas);
3. Mecanismos moleculares que reorganizam o aparelho fotossintético em conformidade com a qualidade da luz e intensidade ou suprimem completamente a fotossíntese. O equilíbrio da quantidade de energia luminosa que é absorvida pela planta e da disponibilidade de CO_2 representa

uma tentativa de evitar o excesso de redução do aparelho fotossintético e a transferência dos elétrons para o O_2 em vez de para a fixação de CO_2 (Mittler, 2002).

A produção de ROS também pode ser reduzida por um grupo de enzimas chamado oxidases alternativas (AOXs) que conseguem desviar os elétrons que fluem através das cadeias de transporte de elétrons e usam-nos para reduzir o O_2 a água (Mittler, 2002). Desta forma elas reduzem a produção de ROS por dois mecanismos:

- Previnem os elétrons de reduzir o O_2 em $O_2^{\bullet-}$;
- Reduzem o nível global de O_2 , o substrato para a produção de ROS, no organito (Mittler, 2002).

A segunda linha de defesa contra os efeitos prejudiciais das ROS diz respeito aos mecanismos de remoção de ROS uma vez formados, que são os antioxidantes e enzimas antioxidantes. A terceira linha de defesa contra ROS consiste na reparação de proteínas danificadas (Gratão *et al.*, 2005).

Perante o excesso de ROS as plantas desenvolveram mecanismos de proteção, nomeadamente pequenas moléculas antioxidantes e enzimas antioxidantes de modo a manter o níveis de ROS sob controlo (Gechev *et al.*, 2006).

O termo antioxidante descreve qualquer componente capaz de sequestrar ROS sem que ele próprio passe por uma conversão a um radical destrutivo. As enzimas antioxidantes são consideradas como aquelas que ou catalisam tais reações, ou estão envolvidas no processamento direto de ROS (Gratão *et al.*, 2005). Contudo estes mecanismos de defesa tornaram-se robustos e como tal as plantas desenvolveram uma rede de enzimas de produção e remoção de ROS de modo a ajustar os níveis destas espécies de acordo com as necessidades celulares nas diversas células e órgãos num determinado tempo e nos diferentes estados de desenvolvimento. Como tal as plantas desenvolveram um sistema antioxidante enzimático e não- enzimático, que juntamente com as enzimas produtoras de ROS mantêm a homeostase de ROS em todos os compartimentos celulares e regulam o ajuste dos níveis de ROS de acordo com as necessidades celulares num determinado momento (Gechev *et al.*, 2006).

Os antioxidantes não enzimáticos incluem o ascorbato (ASC), a glutathiona (GSH), carotenóides, tocoferol, compostos fenólicos, aminoácidos não proteicos, flavonoides e alcalóides (Apel & Hirt, 2004). O ascorbato e a glutathiona, que se encontram em elevadas concentrações nos cloroplastos e noutros compartimentos celulares (5-20 mM de ascorbato e 1-5 mM de glutathiona), são determinantes para a defesa da planta contra o stresse oxidativo (Mittler, 2002).

O ASC é o antioxidante chave primário que reage com os radicais HO^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$ e 1O_2 . Este antioxidante é o principal, e possivelmente o único tampão antioxidante no apoplasto e é um metabolito essencial envolvido com as funções vitais da célula (Gratão *et al.*, 2005). O ASC

desempenha um importante papel na minimização dos danos causados pelos processos oxidativos, realizado pela sua ação sinérgica com outros antioxidantes (Ahmad *et al.*, 2008).

A GSH é um dos principais tampões redox na maioria das células aeróbicas, desempenhando um importante papel em funções fisiológicas, incluindo a regulação redox, conjugação dos metabolitos, homeostase e sinalização celular que desencadeiam respostas adaptativas. O papel da GSH no sistema de defesa antioxidante indica as suas utilizações como marcador de stresse. Recentes evidências indicam que uma elevada concentração de glutathione está correlacionada com a habilidade das plantas em resistir ao stresse oxidativo induzido por metais. Alguns metais conseguem causar a depleção transitória da glutathione e alterações nas atividades das enzimas antioxidantes (Gratão *et al.*, 2005). Em resposta a stresses verifica-se um aumento dos níveis de GSH na planta (Apel & Hirt, 2004).

Os carotenóides podem remover o $^1\text{O}_2$ diretamente, papel este também desempenhado pelos tocoferóis, ou podem prevenir a formação de $^1\text{O}_2$ pela remoção da clorofila no estado tripleto excitado (Asada, 2006). O α - tocoferol impede a propagação em cadeia na autooxidação lipídica, o que o torna uma eficaz armadilha de radicais livres (Ahmad *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos são também metabolitos secundários com capacidade antioxidante que podem constituir proteção celular. As antocianinas atenuam danos fotooxidativos em folhas, através da proteção dos cloroplastos do excesso de radiação altamente energética e removendo ROS (Gratão *et al.*, 2005).

Os níveis de stresse oxidativo nas células são determinados pela quantidade de $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e HO^\bullet (Gratão *et al.*, 2005). Nas células, o equilíbrio entre as atividades das enzimas antioxidantes como superóxido-dismutase (SOD), ascorbato-peroxidase (APX) e catalase (CAT) é essencial para a determinação do nível de estado estacionário do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Mittler, 2002), podendo este último ser diretamente metabolizado pelas peroxidases no apoplasto e pela CAT no peroxissoma (Gratão *et al.*, 2005).

As principais vias de remoção de ROS nas plantas são constituídas por sistemas antioxidantes coordenados entre si, como o ciclo água-água- nos cloroplastos; o ciclo da glutathione-ascorbato- nos cloroplastos, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomas; o ciclo da glutathione-peroxidase (GPX) e catalase (CAT) nos peroxissomas.

O ciclo água-água tem como principal função a remoção do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 no local de produção, encurtando as suas vias, de modo a suprimir a produção de HO^\bullet e a sua interação com as moléculas alvo nos cloroplastos (Asada, 2000). Este ciclo tira a sua energia redutora diretamente do aparelho fotossintético (Mittler, 2002). A SOD atua na primeira linha de defesa contra as ROS, convertendo o $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , enquanto que a APX, glutathione-peroxidase (GPX) e CAT vão eliminar o H_2O_2 que se formou (Apel & Hirt, 2004).

A APX requer um ASC e 1 sistema de regeneração de GSH, o ciclo glutathione-ascorbato. A decomposição de H_2O_2 a H_2O pela APX ocorre pela oxidação do ASC a MDA, o qual pode ser

regenerado pela malondialdeído-redutase (MDAR) usando NAD(P)H como equivalente redutor. O MDA pode dismutar espontaneamente em desidroascorbato (DHA) e a regeneração do ASC é mediada pela desidroascorbato-redutase (DHAR) impulsionada pela oxidação da glutatona (GSH) a glutatona oxidada (GSSG). A partir da GSSG a glutatona-redutase (GR) consegue regenerar a GSH, utilizando como agente redutor o NAD(P)H (Apel & Hirt, 2004).

No ciclo glutatona-peroxidase, a GPX decompõe o H_2O_2 a H_2O , utilizando diretamente a GSH como agente redutor. O ciclo GPX é fechado pela regeneração de GSH a partir de GSSG pela GR (Apel & Hirt, 2004).

A CAT vai degradar o H_2O_2 sem utilização de poder redutor, pelo que constitui uma forma energeticamente eficiente para remover o H_2O_2 (Gratão *et al.*, 2005). Contudo, a CAT só é ativa em concentrações relativamente altas de H_2O_2 e assim quando estas concentrações são baixas, o H_2O_2 é eliminado pela APX e outras peroxidases, com o auxílio do ASC e GSH (redutores), ciclo da glutatona-ascorbato (Gechev *et al.*, 2006).

2.7 Elementos potencialmente tóxicos (PTE)

Na designação de PTE estão incluídos os metais pesados. A definição de metal pesado é bastante variável, baseando-se em diversos parâmetros, tais como: a densidade dos elementos, a massa atômica, o número atômico e a toxicidade (Duffus, 2002). Segundo alguns autores, os metais pesados apresentam uma densidade superior a $5,0 \text{ g cm}^{-3}$ (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

Alguns metais pesados são nutrientes essenciais para as plantas, tal como o Cu, Fe, Mn, molibdénio (Mo), Zn, níquel (Ni) e boro (B), e outros são não essenciais e aparecem na natureza como poluentes, tal como o Cd, mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) (Martins & Mourato, 2008). Apesar do Cu e Zn serem micronutrientes essenciais para o desenvolvimento normal da planta, em concentrações elevadas podem causar toxicidade (Hall, 2002).

Os metais pesados podem assim ser incluídos na principal categoria de poluentes e podem ser encontrados no solo, água e nos gases tóxicos formados na atmosfera pelas reações fotoquímicas. Alguns metais são fortemente retidos no solo, com uma baixa lixiviação, afetando negativamente a biomassa do solo e a fertilidade (Gratão *et al.*, 2005). Também existem outros elementos que podem causar problemas ambientais, como é o caso do alumínio (Al) e As (metalóide), não estando incluídos na designação de metal pesado dada por di Toppi & Gabbrielli, (1999).

A maioria dos metais pesados surge no solo como resultado das atividades humanas, tanto agrícola, como industrial ou mineira. Estes metais podem estar presentes em pesticidas, fertilizantes ou resíduos de várias origens (Reichman, 2002). A contaminação dos solos e da água com metais criou um grande problema ambiental, levando a perdas consideráveis na produtividade da planta.

Muitos contaminantes podem permanecer no ambiente durante muito tempo, acumulando-se a níveis prejudiciais para o ser humano. Um dos maiores problemas que o mundo industrializado enfrenta é a contaminação dos solos, sedimentos e água com químicos tóxicos (Gratão *et al.*, 2005).

Quanto à toxicidade dos metais pesados, vai depender de uma série de fatores, tais como, natureza do metal, forma tóxica existente, biodisponibilidade, solubilidade, mobilidade na planta, taxa de acumulação nos seres vivos, local de acumulação, posição do organismo na cadeia alimentar. O termo metal pesado não é sinónimo de metal tóxico, podendo-se considerar o efeito tóxico provocado por metais pesados não essenciais e o efeito tóxico provocado por metais pesados essenciais quando presentes em elevadas concentrações (Martins & Mourato, 2008). A exposição a metais tóxicos pode intensificar a produção de ROS (Gratão *et al.*, 2005).

Quando as plantas estão expostas a certos iões metálicos, estes alteram o balanço do metabolismo de radicais livres, levando à acumulação de H_2O_2 . O H_2O_2 é convertido a HO^\bullet na presença de metais de transição redox como o Cu^+ e Fe^{2+} , numa reação catalisada pelo metal, via reações de Fenton (figura 1). Os iões metálicos oxidados passam por uma re-redução numa reação subsequente com $O_2^{\bullet-}$. (Mithofer *et al.*, 2004). De modo a limitar a inadvertida formação de HO^\bullet na reação de Fenton, a célula deve manter a concentração dos iões metálicos livres (nomeadamente Fe, Cu e Mn) muito baixa, por ligação a *metalo-chaperones* (Møller *et al.*, 2007). As *metalo-chaperones* são uma família de proteínas que transporta os iões metálicos para locais específicos dentro de uma célula. Contudo existe um outro mecanismo que independentemente da presença do metal também origina HO^\bullet diretamente de H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$, denominado reação de Haber-Weiss (figura 1). (Mithofer *et al.*, 2004).

<u>Reação de Fenton</u>	<u>Reação de Haber-Weiss</u>
$H_2O_2 + Fe^{2+}/Cu^+ \rightarrow HO^\bullet + OH^- + Fe^{3+}/Cu^{2+}$	$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow HO^\bullet + OH^- + O_2$
$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+}/Cu^{2+} \rightarrow Fe^{2+}/Cu^+ + O_2$	

Figura 1 - Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss.

(Fonte: Mithofer *et al.*, 2004)

2.7.1 Biodisponibilidade e acumulação de metais

A biodisponibilidade do metal corresponde às formas que as plantas e outros organismos do solo podem utilizar. A fração de metal que pode ser absorvida por uma planta é chamada de fração biodisponível do metal (Reichman, 2002). Apesar dos metais se poderem encontrar em diferentes formas químicas, tais como, formas precipitadas, adsorvidas, formas existentes na matriz dos minerais do solo, aquela que as plantas conseguem absorver diretamente é a forma solúvel na solução do solo (Martins & Mourato, 2008). A biodisponibilidade do metal vai depender das características do solo, nomeadamente do pH, teor de matéria orgânica e de argila, capacidade de troca catiónica, força iónica, potencial redox, textura e flora microbiana (Martins & Mourato, 2008).

Existem plantas que têm mecanismos para regular a biodisponibilidade dos metais, restringindo a absorção do metal a partir do solo. Outras plantas, denominadas acumuladores ou hiperacumuladoras, consoante os níveis intracelulares encontrados, já conseguem acumular elevadas quantidades de um metal, que até em quantidades bastante inferiores seriam tóxicas para outros organismos (Clemens *et al.*, 2002).

No caso dos metais essenciais, para pequenas ou elevadas concentrações do mesmo verificam-se sintomas de deficiência e toxicidade, respetivamente, existindo uma gama de concentração para a qual o crescimento é ótimo (Martins & Mourato, 2008). É o caso, por exemplo, de elementos como o Cu e o Zn, essenciais para um grande número de processos metabólicos, mas tóxicos em concentrações elevadas. Quanto aos metais não essenciais, causam problemas de toxicidade em concentrações que ultrapassam a tolerância dos organismos, contudo não causam desordens por deficiência em baixas concentrações (Gonçalves, 2000). A atividade redox do Cu, que é importante em muitas reações de transferência de eletrões, como na fotossíntese, pode levar à produção de ROS. O Zn^{2+} é amplamente utilizado como cofator. Os iões de zinco são a chave estrutural ou componentes catalíticos em proteínas de ligação a DNA e enzimas hidrolíticas, respetivamente. Contudo, uma ligação descontrolada pode resultar na inativação das proteínas. Desta forma é fundamental um controlo apertado e regulação da acumulação de metais essenciais a nível celular. As necessidades em metais dos diferentes organelos variam muito, porque a maioria das proteínas que requerem Zn ou Cu estão localizadas fora do citoplasma. Desta forma torna-se essencial coordenar as funções de absorção, translocação e armazenamento, de modo a manter as concentrações de metais essenciais nos diversos tecidos e compartimentos dentro dos estreitos limites fisiológicos (Clemens *et al.*, 2002).

Uma vez que o controlo da acumulação é imperfeito, os organismos têm de lidar com a exposição a elementos indesejados. Para além disso, a falta de especificidade dos sistemas de absorção e distribuição também leva à acumulação de metais como o Cd, que é geralmente considerado não-essencial (Clemens *et al.*, 2002). Estudos recentes indicaram que em leveduras e células de bactérias, virtualmente todo o Cu e Zn, respetivamente, está ligado a ligandos e que qualquer movimento dentro da célula envolve reações de troca entre os ligandos. Este apertado

controlo sobre a disponibilidade do metal dentro da célula requiere a existência de sistemas específicos de distribuição para os oligoelementos (Clemens *et al.*, 2002).

A absorção de iões metálicos provavelmente ocorre através de transportadores secundários, como é o caso dos canais proteicos e/ou proteínas transportadoras acopladas a H^+ . Nos últimos anos têm sido identificados vários transportadores catiónicos através do uso de técnicas moleculares (Clemens *et al.*, 2002). Alguns estudos em leveduras, tornam evidente que grande parte dos transportadores catiónicos apresenta uma grande gama de substratos, permitindo que mesmo os metais não essenciais, como é o caso do Cd, entrem na célula (Clemens *et al.*, 2002).

O excesso de metais essenciais, assim como metais não essenciais, são sequestrados nos vacúolos das células das folhas. Diferentes tipos de células de folhas mostram uma pronunciada acumulação diferencial. O padrão de distribuição varia com a espécie de planta e elemento. A acumulação de Zn em folhas de *T. caerulescens* é 5,0-6,5 vezes superior em células da epiderme do que nas células mesofílicas, enquanto que em *A. halleri* tratadas com metal, pensa-se que as células mesofílicas contenham mais Zn e Cd do que as células da epiderme. Os tricomas desempenham aparentemente o principal papel no armazenamento e remoção de metais (Clemens *et al.*, 2002).

Como foi dito anteriormente algumas plantas podem acumular iões metálicos que são tóxicos para quase todos os organismos mesmo em baixas quantidades. Trata-se de uma característica que pode ser utilizada para limpar os solos contaminados com metais. A acumulação de metais pesados pelas plantas determina tanto o conteúdo de micronutrientes como os teores de metais tóxicos da nossa alimentação (Clemens *et al.*, 2002). Um elemento pode ser fitotóxico para certas plantas mas não apresentar toxicidade significativa para o Homem e vice-versa, acumulando-se na planta, no caso de não ter função biológica, e podendo propagar-se na cadeia trófica e induzir efeitos tóxicos no Homem e outros animais (Silva, 2006). Os efeitos visuais da fitotoxicidade dos metais pesados nas plantas correspondem a uma redução do crescimento radicular e da parte aérea e a um crescimento atrofiado da planta, sintomas foliares específicos que resultam do efeito tóxico do metal (Martins & Mourato, 2008).

O conceito de fitorremediação provocou um notável interesse na acumulação de metais pela planta. A utilização da acumulação como meio de remoção de metais contaminantes do solo e da água tem sido proposta com base em observações bem documentadas de várias espécies de plantas, que além de tolerarem níveis tóxicos de metais no solo ainda os acumulam na sua parte aérea (Clemens *et al.*, 2002). Por essa razão, as plantas ideais para a fitorremediação devem ter as seguintes características: rápido crescimento, elevada biomassa, raízes profundas, de fácil colheita e deve tolerar e acumular uma gama de metais pesados na sua parte aérea (Clemens *et al.*, 2002).

Existem diversas estratégias para evitar a acumulação de metais tóxicos: evitação física de áreas contaminadas; exsudação de agentes complexantes dentro da rizosfera; ligação na parede celular; efluxo de iões metálicos a partir do simplasma; prevenção de transporte de iões metálicos para cima em partes acima do solo; complexação com vários ligandos no simplasma; transporte dos

complexos formados entre o metal e o ligando no vacúolo; armazenamento dos íons metálicos no vacúolo pela complexação com ligandos vacuolares e formação de enzimas resistentes aos metais para minimizar a lesão interna causada pela toxicidade (Gratão *et al.*, 2005).

2.7.2 Cádmio

O Cd é um elemento não essencial, considerado o metal pesado mais tóxico e que causa um efeito prejudicial bastante significativo no metabolismo geral da planta e induz o stresse oxidativo (Gratão *et al.*, 2005). Dado que pelo menos 70% do Cd ingerido pelo Homem é proveniente de alimentos vegetais, estes tornam-se indicadores das concentrações dos contaminantes do meio ambiente (Gomes, 1998).

O Cd tem o número de oxidação (II) e é utilizado em ligas metálicas, pigmentos, baterias e pilhas de Ni-Cd, e também como estabilizante nos plásticos. Apesar do Cd só ter começado a ser utilizado no século XX, a contaminação dos solos com este elemento começou muito mais cedo, pelo facto do elemento estar associado a minérios de Zn, Cu e Pb (Varennnes, 2003). O Cd pode acumular-se no solo devido a atividades antropogénicas tais como a aplicação de alguns fertilizantes fosfatados ou lodo de esgoto, tráfego urbano, estações de energia, indústrias de metalurgia, incineradores de resíduos e fábricas de cimento (Martins *et al.*, 2011). O Cd, móvel no solo sob a forma de ião Cd^{2+} , compete com os íons de Ca^{2+} e K^{+} à superfície de colóides de argila e colóides orgânicos, pelo que a disponibilidade de certos nutrientes interfere na biodisponibilidade e absorção de Cd (Pinto, 2011). Devido à sua grande biodisponibilidade no solo, prejudica ecossistemas sendo rapidamente absorvido pelas plantas, é lixiviado para águas subterrâneas e é facilmente introduzido na cadeia alimentar (Martins *et al.*, 2011).

Os teores médios de Cd nos solos variam de 0,01 a 1 mg Cd kg⁻¹ de solo, sendo a principal via de entrada do elemento para o solo a deposição a partir da atmosfera. Os teores de Cd nas fosforites utilizadas na preparação dos adubos variam desde 2 mg Cd kg⁻¹ de fósforo nos minérios de origem vulcânica até mais de 500 mg Cd kg⁻¹ de fósforo em fosforites de origem sedimentar. A deposição de Cd a partir da atmosfera foi responsável por um aumento de 50% no teor de Cd na camada arável dos solos em menos de 150 anos (Varennnes, 2003). Os limites máximos de Cd no solo arável variam entre estados membros da União Europeia, entre 0,4 e 3 mg kg⁻¹ (Pinto *et al.*, 2009).

Relativamente à mobilidade do Cd no solo verifica-se uma redução com o aumento do pH, da quantidade de colóides capazes de o adsorver e do teor de matéria orgânica. A sua disponibilidade é baixa em solos alagados, por se formar sulfureto de cádmio (CdS), mas em solos ácidos e solos salinos as plantas absorvem mais Cd, devido à formação de complexos solúveis com o ião cloreto (como CdCl^{+}) (Varennnes, 2003).

Não se sabe muito sobre o mecanismo de absorção de Cd^{2+} . Provavelmente é por difusão facilitada através da membrana plasmática. O Cd pode ser transportado facilmente a partir do solo através da raiz da planta para as partes superiores da planta (Mengel & Kirkby, 2001).

A absorção de Cd depende de uma série de fatores, nomeadamente da cultura (os vegetais de folhas como o a alface e o espinafre acumulam mais Cd do que os cereais ou leguminosas de grão), da mobilidade do elemento no solo e do nível de outros cátions, em particular do Zn que é antagónico do Cd (Varennnes, 2003). Também foram encontradas diferenças consideráveis na tolerância ao Cd entre espécies de plantas e genótipos dentro de uma espécie (Pinto *et al.*, 2009).

A acumulação de Cd interfere na assimilação, transporte e utilização de diversos elementos como Ca, Mg, P e K, bem como de água (di Toppi & Gabbrielli, 1999). A absorção de iões Cd parece estar em competição para o mesmo transportador transmembranar com nutrientes, tais como K, Ca, magnésio (Mg), Fe, Mn, Cu, Zn, Ni (Benavides *et al.*, 2005). A substituição do Ca e Mg nos tecidos pelo Cd, sob a forma iónica, deve-se à semelhança dos respetivos raios atômicos (Pinto, 2011). O Cd e o Zn são quimicamente muito semelhantes, sendo o Cd capaz de imitar o comportamento do Zn nas suas funções de absorção e funções metabólicas (Mengel & Kirkby, 2001). A reatividade destes dois elementos é comparável, sendo o Zn mais reativo e o Cd apresentando maior tendência para formar ligações covalentes, especialmente com o enxofre (Gomes, 1998). A presença de um excesso de iões Cd^{2+} vai interferir com a absorção e translocação de Zn por competição, sendo a absorção do Cd diminuída por efeito da aplicação de Ca e Zn (Gomes, 1998).

Uma vez absorvido pelas plantas, o Cd tem um efeito negativo sobre vários processos celulares, que levam a uma redução no crescimento das plantas, clorose das folhas e um aumento da senescência foliar. Estes sintomas visíveis refletem mudanças nos componentes bioquímicos da planta e vias metabólicas, tais como uma diminuição na taxa fotossintética, deficiente absorção de nutrientes, distúrbios na absorção de água e relações de água, indução da peroxidação lipídica e quebra de clorofila, e inibição de muitas enzimas (Martins *et al.*, 2011). No processo fotossintético o Cd afeta a fase clara, inibindo 40% o transporte de eletrões nos PSI e PSII. A nível bioquímico o metabolismo do azoto e dos glúcidos pode ser seriamente afetado (Azevedo, 1995).

Os efeitos de fitotoxicidade provocados pelo Cd refletem-se na integridade das membranas plasmáticas e como consequência, pensa-se que é possível haver inibição da incorporação de nitrato e potássio e diminuição da transpiração (Gomes, 1998). Muitas destas mudanças são consequência do stresse oxidativo induzido pelo aumento de ROS causado pela presença de Cd no compartimento intracelular (Martins *et al.*, 2011).

Certos metais pesados como o Cu e o Fe podem ser tóxicos pela sua participação nos ciclos redox produzindo radicais hidroxilo. Em contraste com estes metais, o Cd é um metal não redox incapaz de participar nas reações de Fenton (Sandalio *et al.*, 2001). Contudo induz o stresse oxidativo nas plantas bloqueando grupos funcionais essenciais em biomoléculas (Schutzendubel & Polle, 2002) e por mecanismos indiretos, já acima citados (interação com a defesa antioxidante,

perturbação da cadeia de transporte de eletrões ou indução da peroxidação lipídica) (Martins *et al.*, 2011).

Dos vários processos de remoção ativados nas células durante a exposição das plantas ao Cd, a complexação do metal pelas fitoquelatinas, a compartimentação em vacúolos, a imobilização ao nível da parede celular, a exclusão através da ação da membrana plasmática e a síntese de proteínas de stresse desempenham papéis muito significativos (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

As fitoquelatinas são compostos de baixo peso molecular, capazes de quelatar os metais. Tratam-se de péptidos derivados da glutathione resultantes da adição sucessiva de 2 a 11 dipéptidos. Estes compostos atuam ativamente na desintoxicação da planta e têm um papel importante na regulação do nível de metal que entra na planta (Azevedo, 1995). A deficiência de fitoquelatinas está relacionada com a hipersensibilidade ao Cd, Cu e As. Como tal, têm sido feitas diversas tentativas para aumentar a formação de fitoquelatinas, que em certos casos levou a uma melhoria ligeira da tolerância e acumulação de Cd. As células de *S. cerevisiae* que sintetizam fitoquelatinas, mostram uma tolerância significativamente elevada a Cd^{2+} e acumulação de Cd aumentada mesmo em concentrações subtóxicas (Clemens *et al.*, 2002).

Algumas plantas como cenouras, alface, espinafre e trigo são acumuladoras de Cd, sendo bastante tolerantes a altas concentrações deste metal no solo e não apresentando sintomas de toxicidade (Pinto, 2011). Na alface, o Cd é acumulado preferencialmente nas folhas mais velhas, as quais serão as primeiras a cair, e assim a planta promove a sua desintoxicação. O nível de Cd presente nas folhas velhas é cerca de 50 a 100% superior ao que existe nas folhas novas. A resposta bioquímica das plantas tolerantes, consiste na síntese de fitoquelatinas. Também as metalotioninas, proteínas capazes de se ligar a metais, são importantes na homeostasia dos metais pesados. Estes compostos são preferencialmente sequestrados nos vacúolos da célula, minimizando os efeitos tóxicos do metal (Azevedo, 1995).

Nos tecidos animais demonstrou-se que o Cd induz alterações do estado antioxidante quer aumentando a produção de radicais superóxido e peroxidação lipídica, ou diminuindo os antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Sandalio *et al.*, 2001). Os efeitos adversos do Cd nos animais verificam-se para níveis inferiores aos tóxicos para as plantas, podendo estas ser aparentemente sãs e levar a intoxicações para os animais, incluindo o Homem (Varennnes, 2003).

Segundo o *Codex Alimentarius* o limite semanal para a ingestão de cádmio recomendado é $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal. A dose letal média (DL_{50}) de Cd para o Homem é de $0,027 \text{ g kg}^{-1}$ de peso vivo (Mendes & Oliveira, 2004).

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 466/2001 da Comissão de 8 de Março de 2001, o teor máximo de Cd nos produtos hortícolas de folha é de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco.

A exposição ao Cd nos humanos ocorre normalmente por via oral (por água e ingestão de alimentos contaminados) e por inalação. A exposição prolongada ao Cd através da alimentação leva à sua acumulação nos rins, reduzindo a eficiência dos mecanismos de filtração, o que permite a excreção de proteínas e glúcidos essenciais, e maiores danos nos rins. O Cd que se acumula nos rins leva muito tempo a ser excretado. O Cd também afeta o sistema nervoso, imunológico, circulatório, reprodutor e o fígado. Também há a possibilidade de ocorrer danos no DNA (Silva, 2006). O Cd substitui o Zn e liga-se irreversivelmente a proteínas originando carcinomas e dermatoses (Mendes & Oliveira, 2004).

2.7.3 Arsénio

O As é um elemento químico classificado como metaloide (Ferreira, 2006). As fundições, os combustíveis fósseis e alguns pesticidas, constituem as principais causas de contaminação dos solos com As, sendo que este elemento ainda hoje é utilizado na indústria de semicondutores, em pigmentos e na indústria do vidro (Varennnes, 2003).

O solo contaminado com As constitui uma das principais fontes de As na água potável. A remediação do solo e água contaminados com As é necessária de modo a proteger a vida humana e a produção agrícola. A utilização da técnica de fitorremediação para limpar os locais poluídos com As incluindo as águas subterrâneas está a ganhar atenção devido às preocupações ambientais e aos custos de remediação associados com os processos de remediação convencionais (Singh & Ma, 2006).

Os teores de As no solo variam entre 5 e 100 mg As kg⁻¹, contudo podem ser encontrados níveis mais elevados nas vizinhanças de minas ou de fundições. Na natureza, o As apresenta diversos números de oxidação e os mais comuns são o (III) e o (V), sendo o As (III) a forma mais disponível para as plantas. Os microrganismos do solo atuam sobre o As alterando o número de oxidação ou metilando-o. Algumas das formas reduzidas ou metiladas são voláteis e perdem-se no solo, persistindo aí arsenatos e arsenitos. Os iões arsenato são adsorvidos de forma mais intensa aos colóides- minerais argilosos, óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio e carbonatos- pelo que o As trivalente está mais associado a casos de toxicidade do que o As (V). A utilização de adubos fosfatados agrava a toxicidade de As, uma vez que os iões fosfato competem eficazmente com o As para os locais de adsorção, substituindo-o e lançando-o na solução do solo (Varennnes, 2003).

Os principais sintomas das plantas quando expostas ao As, vão desde a inibição de crescimento das raízes até à morte da planta (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002).

O As acumula-se nas raízes e geralmente é pouco translocado para a parte aérea, onde é raro encontrar-se em teores superiores a 10 mg As kg⁻¹ de matéria seca. No caso da cultura do arroz,

a presença de níveis elevados de As está associada a um reduzido afilamento e à murchidão das folhas mais jovens que ficam encarniçadas (Varennnes, 2003).

A toxicidade do As para os animais e Homem, deve-se principalmente à ingestão de água contaminada com o elemento e não propriamente ao consumo de plantas (Varennnes, 2003). Em países europeus, é estimado que um consumidor médio esteja exposto a uma contaminação de arsénio pela ingestão de alimentos e água, numa gama de $0,13\text{--}0,56\ \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso vivo, por dia. Esta exposição é maior em crianças com idade inferior a 3 anos, cujos valores estimados de absorção variam entre $0,5\text{--}2,66\ \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso vivo, por dia, indicando valores de exposição 2-3 vezes superiores aos adultos (Calle *et al.* 2011).

A dose letal média do As é de $0,07\ \text{g kg}^{-1}$, sendo todos os compostos de As tóxicos para o Homem (Mendes & Oliveira, 2004).

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 396/2005 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 23 de Fevereiro de 2005 relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal, e que altera a Directiva 91/414/CEE do Conselho, o limite máximo de arsenito de sódio nos produtos alimentares é de $0,01\text{ mg kg}^{-1}$ de peso fresco.

A exposição a compostos tóxicos de As leva a danos ao longo do sistema digestivo, a uma redução do nível de hemácias e leucócitos no sistema sanguíneo, modificações na pele e irritação pulmonar. Elevadas exposições a As provocam infertilidade, alterações na pele, danos no sistema imunitário e consequente redução da resistência a doenças e problemas cardíacos e cerebrais (Silva, 2006).

2.7.4 Cobre

O Cu é um micronutriente das plantas e um componente bastante importante de diversas enzimas e coenzimas envolvidas nas vias metabólicas das plantas (Mourato *et al.*, 2009). Trata-se de um grupo prostético de diversas enzimas, participa na fotossíntese e nos processos de lenhificação (Mourato *et al.*, 2009b).

O teor de Cu nos solos varia frequentemente entre 1 e $60\ \text{mg Cu kg}^{-1}$ de solo, podendo ser bastante superior em solos que estejam contaminados com o metal. A maioria do Cu encontra-se presente na estrutura de vários minerais, onde substitui o Mn, o Fe e o Mg. Em condições oxidantes, devido à baixa concentração do elemento na solução do solo, não se formam óxidos, carbonatos ou sulfatos. O Cu pode-se encontrar adsorvido quimicamente nos colóides minerais do solo, no complexo de troca, quelatado ou em solução (Varennnes, 2003). A adsorção do Cu realiza-se mediante um processo metabólico ativo, que praticamente não é afetado pela concorrência de outros

catiões. Contudo afeta outros catiões, nomeadamente o Zn, ao ocupar preferencialmente os espaços de adsorção na raiz (Sousa, 1995).

O teor de ião cobre (Cu^{2+}) em solução é muito baixo e diminui com o aumento do pH. Em solos alcalinos formam-se compostos insolúveis, tais como o hidróxido de cobre e hidroxicarbonato de cobre e aumenta a adsorção aos colóides. Já a concentração de quelatos de cobre é pouco afetada pela reação do solo. Desta forma, as plantas absorvem Cu principalmente a partir de quelatos de cobre (II) (Varennnes, 2003). A toxicidade do Cu é mais acentuada em solos ácidos, onde há uma maior disponibilidade do elemento devido às condições existentes.

As concentrações normais de Cu nas plantas variam entre 5 a 20 mg Cu kg^{-1} de matéria seca (Varennnes, 2003).

O Cu pode tornar-se fitotóxico em concentrações elevadas, afetando desta forma o desenvolvimento da planta devido à interferência direta ou indireta com diversos processos fisiológicos. O excesso de Cu pode afetar as espécies de diferentes formas e pode causar diversos efeitos, consoante o estado de desenvolvimento da planta no qual o metal foi aplicado, a concentração de Cu e a duração da ação. A acumulação de Cu nos solos pode ser o resultado de propriedades naturais do solo, práticas agrícolas, como o uso de fertilizantes contendo Cu, resíduos orgânicos, lamas de depuração, fungicidas e bactericidas ou de outras atividades antropogénicas (exploração mineira, eliminação de resíduos, etc.) (Martins & Mourato, 2006).

Na presença de elevadas concentrações de Cu ocorre deficiência de Fe, dado que o Cu o substitui em diversas proteínas. Também o Cu origina destruição das membranas e a raiz é mais afetada que a parte aérea, uma vez que o Cu se acumula preferivelmente nesse local, em resultado de uma restrita translocação para a parte aérea (Varennnes, 2003).

Têm sido feitas referências do excesso de Cu em plantas que origina alterações nos parâmetros de crescimento, conteúdo mineral e teor de clorofila, e muitas atividades enzimáticas (Martins & Mourato, 2006). Um sintoma inicial da toxicidade de Cu é a clorose foliar intervenal. Geralmente a clorose tem a forma de manchas brancas ou creme ou lesões (Reichman, 2002). A clorose também pode ser resultado direto da ação de elevadas concentrações de Cu na peroxidação lipídica e assim na destruição das membranas (Marschner, 1995). Com o aumento da exposição, as pontas das folhas e as margens podem tornar-se necróticas. No caso de toxicidade aguda, as folhas podem murchar antes de se tornarem necróticas. A toxicidade do Cu tem um efeito significativo sobre o crescimento e forma da raiz. Em plântulas de dicotiledóneas, quantidades tóxicas de Cu resultam em radículas curtas, de coloração castanho-escuro ou preto e com tendência para ataque de fungos (Reichman, 2002).

Em plantas não tolerantes, a inibição do alongamento da raiz e o dano da membrana plasmática das células da raiz, como refletido pelo aumento do efluxo de potássio (K), são respostas imediatas a uma fonte de Cu elevada (Marschner, 1995).

Quando presente em excesso, o Cu pode causar stresse oxidativo, podendo prejudicar a função fotossintética (Ducic & Polle, 2005). O Cu pode catalisar a formação de radicais livres prejudiciais, tais como os radicais hidroxilo e superóxido. Assim, o principal efeito dos valores fitotóxicos de Cu é a indução de stresse oxidativo, o que pode causar alterações nas vias metabólicas como um mecanismo de defesa que resulta em respostas diferenciais das enzimas em partes das plantas (Martins & Mourato, 2006).

O Cu desempenha um papel importante no metabolismo animal, sendo que um homem adulto necessita de 1-2 mg Cu dia⁻¹ contendo o seu organismo aproximadamente 100-150 mg de Cu.

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 149/2008 DA COMISSÃO de 29 de Janeiro de 2008 que altera o Regulamento (CE) n.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho ao criar os anexos II, III e IV que fixam limites máximos de resíduos para os produtos abrangidos pelo anexo I do mesmo regulamento, o limite máximo de Cu em alface é de 100 mg kg⁻¹ de peso fresco.

A ingestão excessiva de compostos como sulfato de cobre pode causar vômitos, convulsões ou até mesmo a morte (Silva, 2006).

2.7.5 Manganês

O Mn é um micronutriente essencial em todas as fases de desenvolvimento da planta, sendo importante para as suas funções vitais (Ducic & Polle, 2005), sendo frequentemente adicionado a fertilizantes (Silva, 2006). O Mn funciona como um cofator de várias enzimas como o Mn-superóxido dismutase, Mn-catalase, piruvato-carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase. Desta forma, a incorporação de Mn pelas células é essencial, nomeadamente na fotossíntese, onde o Mn desempenha um papel muito importante. O Mn auxilia a síntese de clorofila e assimilação de nitrato e ativa as enzimas de biossíntese de gordura. Participa no processo de formação de riboflavina, ácido ascórbico e caroteno (Ducic & Polle, 2005).

O excesso de Mn é habitual em solos ácidos ou alagados, onde a concentração do ião em solução é elevada (Varenes, 2003). A disponibilidade de Mn aumenta à medida que diminui o pH do solo, sendo que abaixo de 5,5 a toxicidade do Mn pode ser evidente e acima de 6,5 é mais provável que ocorra deficiências deste metal. A pH mais baixo predomina a forma Mn²⁺, estando mais facilmente disponível para a planta. Em pH mais elevado a forma mais predominante é Mn^{3,4-7}, que é menos disponível para as plantas. A acidificação do solo, por exemplo, por utilização de fertilizantes à base de amoníaco, pode resultar em toxicidade de Mn (Ducic & Polle, 2005).

A soja, o tomateiro, a alface, a cevada e o milho são sensíveis à toxicidade de Mn, ao passo que o girassol, o trigo de Inverno, o trevo subterrâneo e a beterraba sacarina são tolerantes. O limiar crítico de toxicidade do Mn varia largamente entre espécies de plantas, podendo variar entre os 200 mg Mn kg⁻¹ de matéria seca no milho e cevada, até 5300 mg Mn kg⁻¹ de matéria seca no girassol

(Varennnes, 2003). O limiar crítico de toxicidade também varia consoante as condições ambientais e até dentro de uma espécie pode variar bastante entre as cultivares. Dentro dos fatores ambientais que afetam o limiar crítico de toxicidade, os que se destacam são a temperatura e a presença de silício. Verifica-se que para temperaturas elevadas, o limiar crítico de toxicidade nas folhas é frequentemente maior do que aquele a baixas temperaturas. Quanto ao nível de silício na própria planta, também faz aumentar a tolerância ao Mn. Relativamente ao efeito da intensidade do excesso de luz sobre a toxicidade de Mn existem relatos contraditórios, por exemplo, de aumentar a gravidade dos sintomas de toxicidade, ou de atenuá-los, devido à diversidade de sintomas de toxicidade de Mn (Marschner, 1995).

Os sintomas de toxicidade caracterizam-se pela formação de manchas castanhas necróticas em folhas, pecíolos e caules, que começam nas folhas inferiores e progridem com o tempo para as folhas superiores. Com o passar do tempo o número e tamanho das manchas pode aumentar, o que resulta em lesões necróticas, acastanhamento das folhas e morte (Reichman, 2002). Particularmente nas dicotiledóneas, tais como feijão e algodão, os sintomas de toxicidade de Mn (clorose intervenal e necrose) são combinados com deformações das folhas jovens, que é um sintoma típico de deficiência de Ca (Marschner, 1995).

Embora estas manchas castanhas oxidadas contenham Mn, a cor castanha não deriva de manganês (MnO_2 por exemplo), mas de polifenóis oxidados. A formação de manchas castanhas é precedida por formação de calose reforçada na mesma área, indicando efeitos tóxicos de Mn^{2+} na membrana plasmática e aumento do influxo de Ca^{2+} como um "sinal" para a formação de calose. A intensidade de formação das manchas castanhas pode constituir um método simples e rápido para a seleção de diferentes cultivares para tolerância ao Mn (Marschner, 1995).

O Mn pode causar stresse oxidativo quando se encontra em excesso e é capaz de prejudicar a função fotossintética (Gratão *et al.*, 2005). Um outro sintoma de toxicidade de Mn é a distribuição desigual de clorofila (Mengel & Kirkby, 2001).

Níveis elevados de Mn levam a um aumento da atividade da ácido indolacético-oxidase (IAA-oxidase), fitohormona cuja degradação acrescida está relacionada com a perda da dominância apical e menor transporte de cálcio para os ápices vegetativos. O excesso de Mn induz a deficiência de nutrientes como o Fe, Mg e Ca (Varennnes, 2003).

A toxicidade de Mn em solos ácidos pode ser corrigida através da calagem. A calagem de solos ácidos altera a disponibilidade de Mn, pela alteração do pH da solução do solo (Ducic & Polle, 2005). A aplicação de matéria orgânica baixa o teor de Mn em solução. O silício pode aumentar a tolerância interna ao Mn (Varennnes, 2003).

A absorção de Mn é feita geralmente através de alimentos, admitindo-se que cada indivíduo consome $2-9 \text{ mg dia}^{-1}$ (Mendes & Oliveira, 2004).

Exposições alargadas a compostos de Mn, quer de forma inalada ou oral, podem provocar efeitos adversos no sistema nervoso, respiratório entre outros. A exposição crónica a grandes quantidades deste elemento parece provocar alucinações (Silva, 2006).

2.7.6 Zinco

O Zn é um micronutriente essencial para as plantas que está presente na maioria dos solos entre 50 e 300 mg Zn kg⁻¹ de solo. Mais de 90% do Zn encontra-se na estrutura de minerais primários e secundários. O Zn substitui o Fe e Mg nos minerais ferromagnesianos, anfíbolos e biotite. Também forma sais insolúveis e substitui o Mg nas esmectites. O restante Zn que está presente no solo encontra-se adsorvido quimicamente aos colóides minerais do solo, no complexo de troca, quelatado pela matéria orgânica ou em solução. O teor de Zn em solução é bastante baixo, encontrando-se em solos ácidos principalmente na forma iónica livre (Zn²⁺). Aproximadamente 60% do Zn que se encontra em solução está quelatado a pequenas moléculas orgânicas, tais como ácidos orgânicos e aminoácidos. As plantas absorvem e translocam o nutriente na forma iónica (Zn²⁺), sendo o Zn mais móvel no floema do que o Fe ou o Mn. O Zn encontra-se em diversas enzimas e é importante no metabolismo dos glúcidos. Nas sementes o Zn está armazenado na forma de fitatos onde se encontra fortemente ligado ao ácido fítico, constituindo uma reserva de Zn para o embrião. Porém, devido à baixa digestibilidade dos fitatos, o Zn das sementes está pouco disponível para os animais monogástricos, incluindo o Homem (Varennnes, 2003).

Solos de textura fina e com elevada capacidade de troca catiónica mantêm maiores quantidades de Zn em posições de troca, facilmente disponíveis para as plantas. A adsorção e precipitação do nutriente aumentam com o pH do solo (Varennnes, 2003).

O Zn pode ser utilizado como suplemento nutritivo de modo a promover o crescimento das plantas, intervindo nas ligações de variadas enzimas aos substratos, como é o caso de diversas desidrogenases (Silva, 2006).

Os solos perto de minas, ou aqueles em que foram aplicados compostos orgânicos muito ricos em Zn, apresentam níveis muito elevados deste elemento. O excesso de Zn interfere com o uso do Fe por diversas proteínas como os citocromos e a aconitase e substitui o manganês no PSII, o que origina sintomas de deficiência de Fe e de Mn. Se o solo for ácido, a toxicidade do Zn pode ser aliviada por calagem, de matéria orgânica e de P (Varennnes, 2003).

O fornecimento de Zn em excesso resulta na redução do crescimento das raízes e da expansão foliar. Geralmente concentrações na ordem dos 150 a 200 µg Zn g⁻¹ de matéria seca de tecido da planta são consideradas tóxicas (Mengel & Kirkby, 2001). Outros sintomas da toxicidade de Zn incluem clorose que pode ser seguida de avermelhamento, devido à produção de antocianinas nas folhas mais jovens. As plantas que apresentam toxicidade ao Zn têm folhas mais pequenas

quando comparadas com as plantas controlo. Nas folhas de algumas espécies surgem manchas castanhas e em casos mais graves podem ocorrer lesões necróticas ou mesmo a morte da folha. Quanto às raízes, verifica-se um amarelecimento e uma redução do crescimento da raiz principal (Reichman, 2002).

Pesquisas de Chardonnens *et al.*, 1999 com *Silene vulgaris* evidencia que a sequestração de Zn no vacúolo constitui um importante mecanismo de remoção do excesso de Zn.

Para o Homem, as necessidades em Zn variam entre 4 e 10 mg dia⁻¹ (Mendes & Oliveira, 2004). Exposições a elevadas quantidades de Zn levam a danos no pâncreas e no metabolismo de proteínas e pode causar aterosclerose (Silva, 2006).

2.7.7 Salinidade

A salinidade do solo é um problema mundial na produção de culturas e é predominantemente induzida pela irrigação em regiões áridas e semiáridas (agricultura de regadio). Aproximadamente um terço da terra irrigada no mundo é afetada pela salinidade. Estes solos que são afetados por sal caracterizam-se por um excesso de sais inorgânicos e devido à sua elevada concentração salina apresentam uma elevada condutividade elétrica (Mengel & Kirkby, 2001).

Diferentes espécies de iões (Na⁺, Cl⁻, HCO₃⁻, PO₄³⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻ e borato) estão presentes muitas vezes em concentrações que afetam o crescimento das culturas. Sob condições áridas os sais acumulam-se na camada superior do solo. Esta acumulação geralmente resulta de evapotranspiração provocando um aumento na água subterrânea que contém sais. Este processo pode ocorrer por irrigação especialmente se a água de irrigação for rica em sais. O efeito é sobretudo marcado onde a água subterrânea está próxima da superfície como ocorre nas depressões ou nos locais de baixa altitude e quando a água de irrigação entra em contacto com a água subterrânea (Mengel & Kirkby, 2001).

As plantas podem ser divididas em dois grupos que diferem na resposta de crescimento para níveis elevados de sal: as plantas halófitas, que crescem naturalmente em ambientes salinos (cerca de 300 kmol m⁻³ a 600 kmol m⁻³ NaCl) e apresentam diversos mecanismos de adaptação (tolerância ao sal), e as plantas não halófitas (glicófitas), que incluem a maioria das espécies de culturas e cuja tolerância ao sal é relativamente baixa. As glicófitas que sofrem de salinidade apresentam um desequilíbrio de iões K⁺/Na⁺ no tecido da planta, muitas vezes acompanhada com um grande excesso de Na⁺. A capacidade das plantas para manter a homeostase de K⁺ e baixas concentrações de Na⁺ no citoplasma parece ser uma determinante importante da tolerância da planta ao sal (Mengel & Kirkby, 2001).

Quanto aos mecanismos de tolerância ao sal são diferentes. Em plantas halófitas terrestres a tolerância ao sal é principalmente baseada na compartimentação de Na^+ e Cl^- no vacúolo e na síntese e acumulação de solutos compatíveis no citoplasma mantendo assim a pressão de turgescência e protegendo as funções macromoleculares citoplasmáticas. A tolerância ao sal varia bastante entre espécies de culturas e cultivares, sendo a maioria das culturas de frutos mais sensível à salinidade do que as de campo, forrageiras ou vegetais. Os efeitos prejudiciais da salinidade são muitas vezes dependentes do estado de desenvolvimento das plantas, sendo a germinação muito sensível (Mengel & Kirkby, 2001).

Dado que o NaCl é muitas vezes o sal dominante em solos salinos, quase toda a pesquisa sobre a salinidade foi efetuada por utilização de NaCl. A salinidade (NaCl) afeta o crescimento das plantas mais sensíveis e diferentes processos metabólicos, como a assimilação de CO_2 , a síntese proteica, respiração e muitas vezes promove a síntese de solutos compatíveis (Mengel & Kirkby, 2001).

A acumulação de sal nos solos leva a um pobre crescimento da cultura, sendo que a produtividade e qualidade das culturas são baixas. O desequilíbrio de iões e a toxicidade contribuem, principalmente, para os efeitos a longo prazo. As plantas que crescem em *habitats* salinos são muitas vezes atrofiadas com pequenas folhas amorfadas verde azuladas e o crescimento da parte aérea é geralmente mais reduzido do que o crescimento da raiz. O crescimento e desenvolvimento de folhas jovens são geralmente favorecidos sobre folhas maduras, as quais podem acumular elevadas concentrações de iões tóxicos levando à morte prematura a fim de garantir o desenvolvimento das folhas jovens (Mengel & Kirkby, 2001). A longo prazo, as respostas de crescimento à salinidade serão determinadas pela concentração máxima de sal tolerada pelas folhas completamente expandidas (Marschner, 1995).

A presença de sais solúveis no meio nutritivo pode afetar o crescimento de plantas de diversas maneiras. Em primeiro lugar as plantas podem sofrer de stresse hídrico. Um solo salino geralmente contém uma quantidade abundante de água, mas de água de baixa disponibilidade. Em segundo lugar, concentrações elevadas de iões específicos podem ser tóxicas e induzir desordens fisiológicas (Na^+ , Cl^-) e em terceiro lugar desequilíbrios iónicos intracelulares (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) que podem ser causados por uma elevada concentração de sal (Mengel & Kirkby, 2001).

As radículas de sementes em germinação são particularmente sensíveis às elevadas concentrações de iões na solução do solo. Uma desvantagem adicional da elevada concentração de sal na solução do solo é o seu efeito osmótico. Uma concentração elevada de solutos significa um baixo potencial de água e, por conseguinte, a absorção de água pelas raízes das plantas é restrita. O grau de salinidade é geralmente medido no extrato de água de uma massa de solo como condutividade elétrica expressa em dS m^{-1} , e os aumentos de condutividade com a concentração de eletrólito. Os solos afetados por sais geralmente apresentam condutividade na gama de 4-20 dS m^{-1} . Nos EUA um valor de 4 dS m^{-1} é considerado crítico para as culturas (Mengel & Kirkby, 2001).

Enquanto que os efeitos do stresse hídrico ocorrem na região meristemática de folhas mais jovens, a toxicidade por sal ocorre predominantemente em folhas maduras. Sob um severo stresse salino, o citoplasma e o apoplasto podem ser sobrecarregados com Na^+ , como acontece quando o vacúolo é preenchido e as folhas continuam a transpirar. A acumulação de iões de sódio no apoplasto da folha pode conduzir à desidratação dos tecidos. O excesso de Na^+ sobre K^+ pode resultar em deficiência de K^+ . Elevados níveis de Na^+ podem afetar as enzimas e organitos presentes no citoplasma e enzimas do apoplasto. Algumas enzimas são mais sensíveis ao sal do que outras, mas quando os níveis tóxicos citoplasmáticos são muito elevados por períodos superiores a 24 horas, todos os processos metabólicos são afetados pelo Na. Os iões de sódio podem interferir com os locais catiónicos envolvidos na ligação ao K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , pelo que a toxicidade por Na^+ pode resultar na interação com os locais de ligação destes iões. O ião cloreto também é tóxico, mas pouco se sabe sobre os alvos fisiológicos, sugere-se que interfere com locais de ligação aniónicos, por exemplo de RNA (Mengel & Kirkby, 2001).

A síntese proteica é largamente prejudicada pela salinidade. Os efeitos de desidratação pelos sais, os desequilíbrios do rácio K^+/Na^+ citoplasmático e a toxicidade de Cl^- levam geralmente a uma maior redução da concentração de proteínas do que sob condições de stresse hídrico (Mengel & Kirkby, 2001). Uma resposta típica ao stresse salino é a rápida acumulação de prolina livre. Quando as plantas são expostas a elevados teores de sal no solo, muitas plantas acumulam elevadas quantidades de prolina. A prolina tem sido encontrada para proteger as membranas celulares da cebola contra os danos causadas pelo sal (Demiral & Turkan, 2005).

O nível de salinidade e a área foliar são normalmente inversamente relacionados. Com o aumento da salinidade a perda de água por planta por transpiração pode desta forma diminuir. Para além da área foliar total, também a fixação líquida de CO_2 por unidade de área foliar pode diminuir, ao passo que a respiração (respiração no escuro) aumenta, levando a uma drástica redução na assimilação líquida de CO_2 por unidade de área foliar por dia. As menores taxas de fixação líquida de CO_2 durante o período de luz podem-se dever à deficiência de água e fecho parcial dos estomas, perda de turgescência das células mesófilas através da acumulação de sais no apoplasto, ou efeitos tóxicos diretos dos iões (Marschner, 1995).

A fotossíntese da parte aérea total muitas vezes não é informativa para uma interpretação causal dos mecanismos de danos por sal, visto que os sais se acumulam principalmente em folhas maduras. No arroz, em condições de baixa salinidade, a fotossíntese na parte aérea total não foi afetada, mas foi nas folhas mais velhas, onde a diminuição na fotossíntese foi inversamente relacionada com a concentração de Na^+ no apoplasto das folhas (Marschner, 1995).

A intensidade, duração e taxa de progressão do stresse irão influenciar as respostas da planta à escassez hídrica e salinidade, porque estes fatores irão influenciar na atenuação dos processos associados à aclimação. As respostas de aclimação à salinidade também incluem a síntese de solutos compatíveis bem como ajustes no transporte de iões (como absorção, extrusão e

sequestração de íons). Estas respostas acabarão por levar à restauração da homeostase celular, desintoxicação e portanto, à sobrevivência sob stresse (Chaves *et al.*, 2009).

Uma estratégia para combater os crescentes problemas associados à salinidade dos solos é a seleção e melhoramento de espécies de cultura para tolerância à salinidade. Outra questão importante é o uso de plantas halófitas para a produção de alimentos. Para além da sua produtividade em solos salinos, o cultivo de plantas halófitas inclui a utilização de águas residuais salinas, água salobra natural ou mesmo de água do mar. A *greenification*² da terra deserta em zonas costeiras através da utilização de recursos ilimitados de água do mar é uma aplicação prática e a conversão de plantas tolerantes ao sal em culturas um importante desafio (Mengel & Kirkby, 2001).

Os indivíduos adultos necessitam de cerca de 1 a 3 g dia⁻¹ de NaCl e regra geral doses superiores não são perigosas dada a eficiência dos rins em excretar este elemento (Mendes & Oliveira, 2004). Contudo uma ingestão excessiva de sal pode levar a um aumento da pressão arterial, aumento do risco de derrame, retenção de líquidos, aumento do risco de osteoporose, aumento da excreção urinária de Ca, aumento do risco de cancro de esófago e estômago, hipertrofia ventricular esquerda e asma (Gilbert & Heiser, 2005).

² Não foi encontrada tradução adequada para a palavra *greenification*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Ao longo deste trabalho foram realizados ensaios de germinação e crescimento e ensaios de rega para estudar o efeito de alguns elementos potencialmente tóxicos (PTE³) e da salinidade (na forma de cloreto de sódio, NaCl) bem como as alterações fisiológicas daí resultantes em plantas de alface (*Lactuca sativa*, var. Blond Paris). Para o ensaio de germinação e crescimento os PTE utilizados foram o Cd, As, Cu, Mn, Zn e também se utilizou NaCl. Para o ensaio de rega os PTE utilizados foram o Cd, As e Cu e também se pretendeu avaliar a resistência à salinidade, tendo-se para tal utilizado NaCl. Estes ensaios pretenderam simular situações reais de utilização de meios contaminados para germinação e crescimento de alface, bem como a simulação de uma cultura em que foi efetuada uma rega com soluções contaminadas com os respetivos PTE e NaCl.

3.1 Plantas utilizadas

Neste trabalho foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa*, var. Blond Paris) fornecidas pela empresa Póvoa Semente.

3.2 Ensaio de germinação e crescimento em meio contaminado

Para o ensaio de germinação e crescimento prepararam-se soluções com diferentes PTE (Cd, As, Cu, Mn, Zn) e também com NaCl de modo a avaliar o efeito na germinação e no crescimento das plântulas numa fase inicial de desenvolvimento. Este efeito foi avaliado a partir do controlo dos pesos e do crescimento na fase inicial com concentrações crescentes. Para isso foram preparadas placas de Petri para cada uma das seguintes concentrações dos PTE em causa: 0; 5; 10; 25; 50; 100; 150; 250; 350; 500 μM e 0; 5; 10; 25; 50; 100; 150; 250; 350; 500 mM de NaCl. Todas as modalidades do ensaio foram realizadas em triplicado. Preparou-se uma solução stock num balão de 200 mL tendo em conta a massa molar (MM); $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MM = 201,33 g mol^{-1}), $\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MM = 312,02 g mol^{-1}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MM = 249,69 g mol^{-1}), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MM = 169,01 g mol^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MM = 287,54 g mol^{-1}), NaCl (MM = 58,44 g mol^{-1}). Cada placa, devidamente identificada, levou uma camada de algodão cardado e uma folha de papel de filtro por cima. A partir do balão de 200 mL retirou-se o volume necessário para balões de 100 mL de modo a obter as soluções de concentração pretendida após ajuste do volume com água desionizada.

³ Será utilizada a designação de PTE como abreviatura de “elementos potencialmente tóxicos”, proveniente da expressão em inglês *Potentially Toxic Elements*, para indicar o conjunto de elementos químicos que foram utilizados neste trabalho.

Colocou-se a solução contaminada nas respectivas caixas de Petri identificadas com a concentração pretendida, de modo a deixar o algodão cardado e o filtro sempre húmidos. De seguida distribuíram-se 25 sementes por cada uma das caixas, que foram depois fechadas com papel aderente. As caixas foram cobertas e colocadas no interior da câmara de crescimento, a uma temperatura constante de 25 °C e uma humidade relativa de 65 %. Ao fim de 3 dias as caixas foram destapadas, após ter ocorrido a germinação. As placas foram mantidas nas mesmas condições durante 2 semanas, para avaliação do efeito dos PTE e NaCl nas plântulas nas fases iniciais de desenvolvimento após a germinação. Durante este período foi adicionada solução sempre que necessário, de modo a deixar o algodão húmido.

3.3 Ensaios de rega

Para os ensaios de rega foram preparados tabuleiros, tendo-se colocado em cada um 30 cilindros de turfa previamente humedecidos e cada cilindro com 3 sementes de alface. Os tabuleiros foram colocados no Horto da Unidade de Investigação de Química Ambiental do Instituto Superior de Agronomia na estufa exterior. As turfas foram mantidas humedecidas com água desionizada de modo a fornecer um meio adequado à germinação das sementes.

Após a germinação as plantas foram regadas com água desionizada durante 18 dias. Depois deste período aplicou-se solução nutritiva de *Hoagland* durante 14 dias até as plantas se encontrarem bem desenvolvidas. Quando tal se verificou recolheram-se 3 turfas de cada tabuleiro uma vez por semana, tendo o ensaio decorrido durante 42 dias. Após a primeira colheita, que determinou o tempo zero deste ensaio, continuou-se a aplicar solução nutritiva de *Hoagland* ao tabuleiro controlo e começou-se a aplicar solução nutritiva de *Hoagland* contendo 50 µM de Cd, 50 µM de As, 100 µM de Cu, e 25 mM de NaCl nos respetivos tabuleiros. A solução nutritiva de *Hoagland* é constituída por uma solução de macronutrientes (6,0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 6,0 mM KNO_3 ; 2,5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 mM KH_2PO_4) e por uma solução de micronutrientes (100 µM H_3BO_3 ; 100 µM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 30 µM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1µM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 µM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 µM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 75 µM FeNaEDTA).

O cádmio foi aplicado na forma de cloreto de cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), o arsénio na forma de arsenato de sódio ($\text{AsHNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e o cobre na forma de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

No dia das colheitas, só após estas serem efetuadas é que se aplicaram as soluções, tendo o cuidado de nos restantes dias colocar solução sempre que necessário, de modo a manter as turfas húmidas.

3.4 Determinações analíticas

3.4.1 Ensaio de germinação e crescimento em meio contaminado

De modo a avaliar o efeito dos PTE em estudo e do NaCl na germinação das sementes e nas plântulas de alface, determinou-se a taxa de germinação, a biomassa e o índice de tolerância.

3.4.1.1 Determinação da taxa de germinação, biomassa e do índice de tolerância

Com o objetivo de se determinar a taxa de germinação, procedeu-se à contagem do número de sementes germinadas ao fim de 3 dias. Os resultados do ensaio foram definidos em percentagem de sementes germinadas.

Para a determinação do efeito no crescimento, foram usadas as sementes germinadas, após 2 semanas de crescimento nos respetivos meios contaminados. Cada amostra foi constituída por 10 plântulas. O crescimento foi avaliado pelo peso das plântulas e calculou-se o índice de tolerância, o qual foi definido como o peso das amostras obtidas na presença de contaminante em relação a amostras obtidas em condições equivalentes em meio não contaminado. Este índice foi expresso em valor relativo em relação ao controlo.

3.4.2 Ensaios de rega

O efeito dos PTE em estudo e do NaCl nas plantas de alface foi avaliado pela realização de algumas determinações analíticas, como o número de folhas, biomassa, teor de matéria seca, teor de clorofila pelo método não destrutivo com o aparelho *Hansatech* e composição mineral.

3.4.2.1 Determinação do teor de matéria seca

Sempre que se realizou a recolha das plantas, procedeu-se à separação das raízes e terra da parte aérea, sendo realizadas análises apenas à parte aérea. As folhas, após a pesagem em fresco, foram colocadas na estufa a 80 °C durante cerca de 2-3 dias, até massa constante, determinando-se nessa altura a massa seca. Com as massas secas e frescas, foi possível determinar o teor de matéria seca, utilizando a expressão:

$$\% \text{Matéria Seca} = (\text{Matéria Seca} \times 100) / \text{Massa fresca}$$

Esse material depois de pesado foi colocado em copos de tampa branca, os quais permaneceram numa bancada do laboratório até se proceder à preparação das amostras para determinação dos elementos minerais.

3.4.2.2 Determinação do conteúdo mineral

Para a determinação do conteúdo mineral utilizaram-se apenas as folhas. Foi utilizado o material vegetal seco proveniente da determinação do teor de matéria seca. As amostras foram maceradas até ficarem em pó, tendo-se pesado cerca de 0,5 g de folha em tubos de *teflon*. Nesses tubos colocaram-se 5 mL de ácido nítrico (HNO_3) fechando-se os tubos de imediato. Os tubos com amostra e o que continha apenas ácido nítrico foram colocados no microondas (CEM MDS 2000) de modo a dar início à digestão, durante a qual as amostras são sujeitas a elevadas temperaturas e pressões para que toda a matéria orgânica seja digerida, havendo libertação de dióxido de carbono e vapor de água. Quando a digestão ficou completa, o conteúdo dos tubos foi transferido para balões de 25 mL e o volume acertado com água desionizada. Esta última etapa foi realizada na *hotte*.

Os minerais estudados foram o Cd, As, sódio (Na), K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca. O Cd foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite, enquanto que os restantes elementos foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica de chama. Na figura 2 é possível visualizar o interior do microondas onde as amostras foram digeridas.

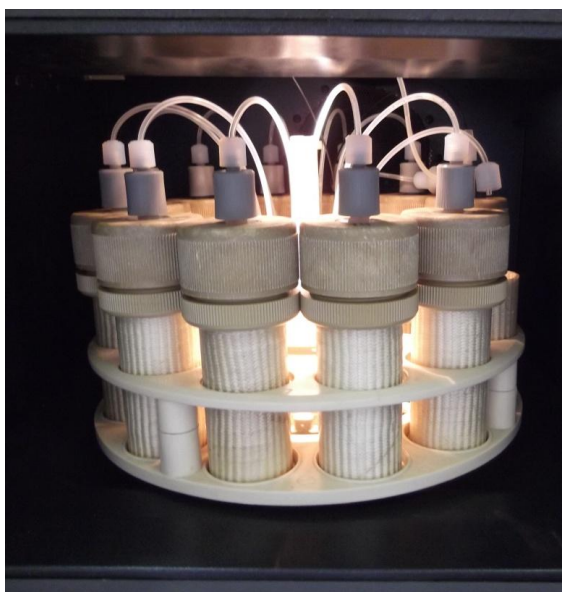


Figura 2 - Imagem do interior do microondas (CEM MDS 2000).

3.4.2.3 Determinação da clorofila pelo método não destrutivo- *Hansatech*

Sempre que se procedeu à recolha do material, mediu-se a clorofila pelo método não destrutivo utilizando o aparelho *Hansatech* (figura 3), sendo realizadas medições em 8 folhas das plantas controlo e 8 folhas das plantas com stresse induzido. Em cada folha realizaram-se diversas medições em duas zonas distintas da folha, devido à grande diferença existente entre estas partes (figura 4).



Figura 3 - Medição da clorofila pelo método não destrutivo com o aparelho *Hansatech*.



Figura 4 - Zona de medições de clorofila numa folha de alface.

3.4.2.4 Determinação da correlação entre o teor de clorofila e o valor *Hansatech*

Para a obtenção da curva de correlação entre os valores medidos pelo aparelho *Hansatech* e o teor de clorofila, procedeu-se à recolha de algumas amostras de folha com diversas tonalidades, desde o verde-claro até ao verde-escuro. Procedeu-se à medição da clorofila com o aparelho *Hansatech* e retiraram-se 0,06 g dessas amostras as quais foram maceradas com 10 mL de solução acetona/Tris (80:20) e centrifugadas a 10 000 x g, à temperatura de 6 °C, durante 15 minutos. O sobrenadante foi colocado em cuvetes de vidro e a absorvância foi lida no espectrofotómetro a 537, 647 e 663 nm. Utilizando-se as equações de Sims & Gamon (2002) foi possível determinar a concentração de clorofila a, b e totais, expresso em $\mu\text{mol mL}^{-1}$:

$$[\text{Clorofila a}] = 0,01373 \cdot \text{Abs}_{663} - 0,000897 \cdot \text{Abs}_{537} - 0,003046 \cdot \text{Abs}_{647}$$

$$[\text{Clorofila b}] = 0,02405 \cdot \text{Abs}_{647} - 0,004305 \cdot \text{Abs}_{537} - 0,005507 \cdot \text{Abs}_{663}$$

$$[\text{Clorofila total}] = \text{clorofila a} + \text{clorofila b}$$

Os resultados obtidos para a clorofila a, clorofila b, clorofila total, foram depois expressos por grama de amostra ($\mu\text{mol g}^{-1}$).

3.5 Tratamento estatístico

Para o tratamento estatístico dos resultados utilizou-se o programa estatístico "SPSS Statistics 17.0", tendo sido aplicada a análise de variância a um fator (ANOVA), de modo a avaliar o efeito das diferentes concentrações de metais nas plantas de alface. De modo a comparar as médias utilizou-se o teste de Tukey, a um nível de confiança de 95%.

As letras minúsculas e maiúsculas foram utilizadas para indicar as médias onde há diferenças significativas.

No ensaio de germinação e crescimento as letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) para diferentes concentrações de PTE ou de NaCl e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os PTE para uma mesma concentração.

No ensaio de rega as letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas concentrações de PTE ou NaCl para um dado dia.

As barras de erro das colunas nos gráficos, representam o desvio padrão da média das amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados do ensaio de germinação e crescimento

4.1.1 Taxa de germinação

As sementes foram registadas como germinadas quando foi possível observar a olho nú a radícula, após 3 dias desde o início do ensaio.

No quadro 2 são representados os valores relativos à taxa de germinação de sementes de alface expostas a diferentes concentrações de PTE em estudo, bem como das sementes expostas a diferentes concentrações de NaCl.

Quadro 2 - Taxa de germinação de sementes de alface expostas a diferentes concentrações de PTE e NaCl.

$\bar{x} \pm \sigma$	Concentração (μM)									
	0	5	10	25	50	100	150	250	350	500
Cd	95 \pm 2,3 a	97 \pm 4,62 a	96 \pm 6,92 a	92 \pm 4,00 a	95 \pm 6,11 a	92 \pm 6,93 a	89 \pm 2,31 a	91 \pm 2,31 a	96 \pm 0,00 a	97 \pm 2,31 a
As	97 \pm 4,6 a	97 \pm 4,6 a	93 \pm 4,6 a	96 \pm 4,00 a	97 \pm 2,31 a	91 \pm 2,31 a	93 \pm 4,62 a	96 \pm 4,00 a	91 \pm 6,17 a	93 \pm 4,62 a
Cu	97 \pm 2,31 a	89 \pm 2,31 ab	91 \pm 2,31 ab	84 \pm 4,00 b	89 \pm 2,31 ab	92 \pm 4,00 ab	83 \pm 8,33 b	91 \pm 2,31 ab	91 \pm 2,31 ab	85 \pm 2,31 b
Mn	99 \pm 2,31 a	92 \pm 4,00 a	87 \pm 4,62 a	89 \pm 4,62 a	81 \pm 10,07 a	87 \pm 6,11 a	88 \pm 4,00 a	85 \pm 12,22 a	87 \pm 4,62 a	89 \pm 2,31 a
Zn	81 \pm 8,33 ab	83 \pm 2,31 ab	81 \pm 2,31 ab	77 \pm 8,33 a	87 \pm 4,62 ab	91 \pm 2,31 ab	89 \pm 4,62 ab	87 \pm 2,31 ab	83 \pm 6,11 ab	92 \pm 4,00 b
	Concentração (mM)									
	0	5	10	25	50	100	150	250	350	500
NaCl	91 \pm 6,11 a	92 \pm 8,00 a	88 \pm 8,00 a	91 \pm 2,31 a	92 \pm 6,93 a	72 \pm 13,86 a	39 \pm 8,33 b	não ocorreu germinação		

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) para diferentes concentrações de PTE ou de NaCl.

Pela observação do quadro 2, é possível verificar que não houve diferenças significativas na taxa de germinação no ensaio com Cd, As e Mn. Já no ensaio com Cu houve diferenças significativas entre o controlo e as concentrações de 25, 150 e 500 μM . No ensaio com Zn, apenas houve diferenças significativas entre 25 e 500 μM . Contudo nestes dois casos não foi visível uma tendência na taxa de germinação derivada das variáveis em estudo; também a existência de sementes não viáveis poderá ter dado origem às pequenas variações observadas.

Li *et al.* (2005) verificaram em *Arabidopsis* para o Cu e Zn um ID₅₀ (50 % de inibição) superior a 50 mM. Nesse ensaio as sementes foram registradas como germinadas quando era visível a rutura do revestimento das mesmas.

Estudos semelhantes em sementes de alface indicam que dentro desta gama de concentrações, não se verificam efeitos da aplicação de Cd e Cu na germinação, obtendo-se taxas de germinação quase sempre constantes e superiores a 90 % (di Salvatore *et al.*, 2008). As sementes foram consideradas germinadas quando apresentavam uma raiz com mais do que 1 mm, ao fim de 72h. Di Salvatore *et al.* (2008) efetuaram estes ensaios de germinação em dois meios, agar e papel de filtro, tendo obtido melhores resultados com agar, dado que o papel de filtro interage com os iões metálicos, reduzindo a sua biodisponibilidade. Também o tegumento constitui uma barreira entre o embrião e o seu ambiente imediato.

Mann *et al.* (2002) observaram que a aplicação de Mn não afetou significativamente a taxa de germinação de sementes de soja em solo ao fim de 15 dias, nas condições em que o ensaio foi realizado.

Também Abedin & Meharg (2002) observaram que a exposição ao As não afetou a taxa de germinação das sementes de uma variedade de arroz, ao fim de 7 dias. Nesse ensaio as sementes foram consideradas germinadas quando a plúmula e a radícula estavam prolongadas a mais de 2 mm da junção.

Relativamente ao ensaio com NaCl, como se pode observar no quadro 2, houve um decréscimo da taxa de germinação com o aumento da concentração de NaCl a partir de 100 mM, tendo havido diferenças significativas a partir de 150 mM, não tendo ocorrido germinação a 250, 350 e 500 mM.

Sabe-se que a salinidade reduz o potencial osmótico do meio, levando ao prolongamento do período de emergência da planta. A redução significativa da germinação das sementes, provocada pela salinidade, deve-se ao efeito tóxico dos sais, cujos iões atingem níveis tóxicos no embrião, e à seca fisiológica produzida, pois com o aumento da concentração de sais ocorre uma diminuição do potencial hídrico, afetando a cinética de absorção de água pelas sementes (Tobe *et al.*, 2000).

Keshavarzi (2012) determinou os efeitos dos níveis de salinidade (0, 50, 100 e 150 mM) na germinação de alface e verificou que com o aumento da salinidade, a percentagem e taxa de germinação de sementes decresceram, de modo que, a um nível de salinidade de 150 mM a germinação atingiu o valor mínimo (8,33 %). As sementes foram consideradas germinadas quando o seu comprimento radicular era superior a 3 mm. Atiş (2011), determinou os efeitos dos níveis de salinidade (0, 50, 100, 150, 200 e 250 mM NaCl) na germinação de quatro cultivares de sorgo e verificou pelos resultados obtidos que a germinação foi negativamente afetada pelo aumento dos níveis de sal.

4.1.2 Biomassa

Na figura 5 estão representados os gráficos da variação da biomassa das plântulas expostas a diferentes concentrações de PTE e de NaCl.

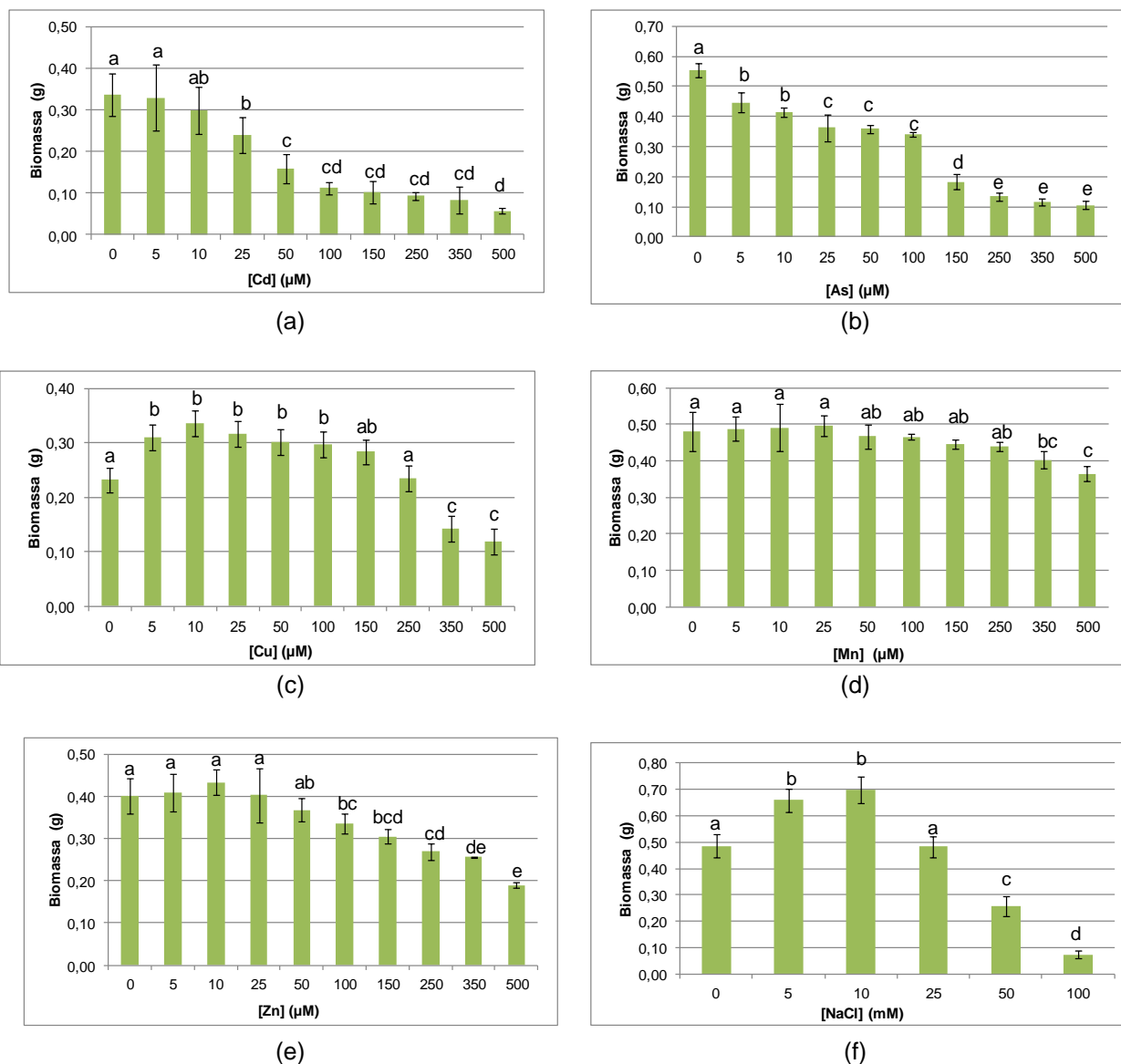


Figura 5 - Variação média da biomassa (g) das plântulas de alface sem contaminação e expostas a diferentes concentrações de Cd (a), As (b), Cu (c), Mn (d), Zn (e) e NaCl (f).

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) para diferentes concentrações de PTE ou de NaCl. As barras de erro indicam os valores de desvio padrão.

Pela análise da figura 5 observa-se que houve um decréscimo da biomassa com o aumento da concentração de Cd, sendo a diferença significativa a partir dos 25 μM de Cd relativamente ao controlo. Também foi possível detetar visualmente um decréscimo gradual do desenvolvimento das plântulas, nomeadamente a partir dos 25 μM, como se pode ver na figura em anexo (A1). Corrêa et

al. (2006) verificaram um decréscimo da biomassa de alfaces com o aumento da concentração de Cd no solo, 10 dias após a plantação.

Observa-se na figura 5 que com o aumento da concentração de As houve um decréscimo da biomassa das plântulas, existindo diferenças significativas relativamente ao controlo logo a partir de 5 μM , pelo que a adição de baixas concentrações de As levam a uma redução significativa da biomassa, o que também foi detetado visualmente (figura em anexo A2). Abedin & Meharg (2002) obtiveram um comportamento semelhante em arroz, relativamente ao comprimento da raiz e da parte aérea, após 7 dias de crescimento.

Verifica-se que houve um aumento da biomassa das plântulas até 10 μM de Cu, uma vez que se trata de um metal essencial, e a partir dessa concentração houve um decréscimo. Entre 5 e 100 μM as plântulas apresentaram um peso superior relativamente ao controlo, sendo essa diferença significativa, e só a partir de 350 μM é que o peso foi significativamente inferior ao controlo. Também visualmente se detetou que as plântulas estavam menos desenvolvidas a partir de 350 μM , apesar de terem começado a tombar a partir de 50 μM (figura em anexo A3). Ahsan *et al.* (2007) observaram um decréscimo significativo na biomassa entre o controlo e 500 μM de Cu em plântulas de arroz, 4 dias após a germinação. Mahmood *et al.* 2005 observaram em milho uma redução do comprimento das raízes e parte aérea, 3 dias após a germinação, para concentrações elevadas de Cu, as quais causaram danos no desenvolvimento das plântulas.

O Mn também é um micronutriente essencial e como tal, como se verifica pela figura 5 houve um aumento da biomassa das plântulas até 25 μM , decrescendo a partir daí. Tal como no Cu, apenas se verificou um decréscimo significativo da biomassa relativamente ao controlo a partir de 350 μM . Contudo as plântulas estavam visualmente semelhantes em termos de desenvolvimento, exceto para 500 μM onde já se apresentavam tombadas (figura em anexo A4). Estudos em fava mostraram um decréscimo evidente nas raízes (52%) e no desenvolvimento da parte aérea (62,92%) para uma concentração de Mn de 160 μM , ao fim de 15 dias a crescerem em solução hidropónica (Arya & Roy, 2011). Neste trabalho esse efeito não se verificou, uma vez que não houve diferenças significativas nessa gama de concentrações e o controlo.

Pela figura 5 verifica-se que houve um aumento da biomassa das plântulas até 10 μM de Zn, dado tratar-se de um micronutriente essencial, ocorrendo um decréscimo a partir dessa concentração, sendo que a partir de 100 μM é que o decréscimo foi significativo relativamente ao controlo. Contudo as plântulas estavam visualmente semelhantes em termos de desenvolvimento até 150 μM (figura em anexo A5). Mahmood *et al.* 2007 observaram que a altura da parte aérea de plântulas de arroz para 5 e 10 μM de Zn foi cerca de 18% inferior à das plântulas controlo, 3 dias após a germinação.

Quanto ao ensaio com NaCl, houve um aumento significativo da biomassa das plântulas até 10 mM de NaCl quando comparado com o controlo e um decréscimo a partir daí. Contudo só a partir

de 50 mM é que se observou uma redução significativa da biomassa face ao controlo. Também foi visível uma redução do desenvolvimento das plântulas a partir de 50 mM (figura em anexo A6).

Keshavarzi (2012) verificou que aumentos dos níveis de salinidade levaram a um grande decréscimo no peso fresco de plântulas de alface. As plântulas apresentaram os seguintes pesos ao fim de 8 dias: 0,039 g para 0 mM, 0,011 g para 50 mM, 0,003 g para 100 mM e 0,0006 g para 150 mM. Este autor diz que a salinidade está a atrasar o crescimento da planta sob redução dos efeitos fotossintéticos, isto é causa do fecho dos estomas e redução da entrada de água para a planta, de modo que causam uma redução duplicada do peso da planta.

Atiş (2011), verificou que o aumento dos níveis de sal afetou negativamente o crescimento de plântulas de sorgo.

4.1.3 Índice de tolerância

A partir dos resultados do ponto anterior foi calculado o índice de tolerância das plântulas em relação ao tempo zero, como definido no ponto 3.4.1.1. Nas figuras 6 e 7 estão representados os gráficos do índice de tolerância das plântulas de alface para diferentes concentrações de PTE e de NaCl, respetivamente.

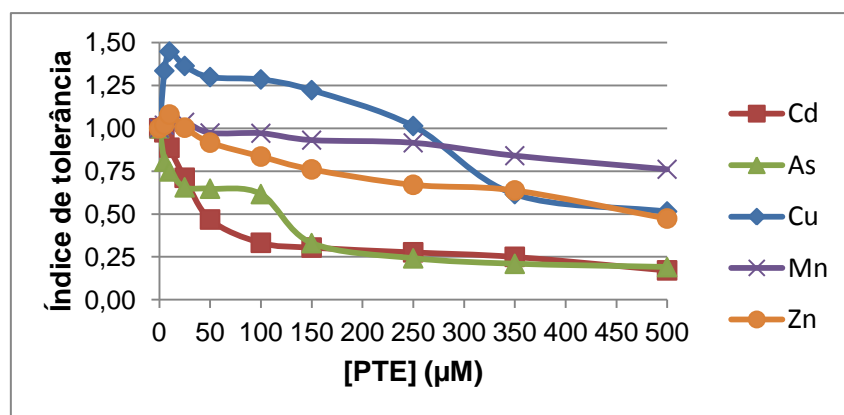


Figura 6 - Índice de tolerância das plântulas de alface para diferentes concentrações de PTE (Cd, As, Cu, Mn e Zn) (μM). (Análise estatística em anexo).

Pela análise da figura 6 e do quadro A1 é possível observar que até 150 μM as plântulas apresentaram um índice de tolerância ao Cu significativamente superior quando comparado com os restantes PTE. Observa-se que para a concentração mais elevada, o índice de tolerância das plântulas relativamente ao Cu e Zn reduziu-se quase para metade. Ahsan *et al.* (2007) observaram em sementes de arroz germinadas que o índice de tolerância ao Cu para 500 μM foi de cerca de 35%.

Mahmood *et al.* (2007) verificaram em sementes de cevada, arroz e trigo um decréscimo do índice de tolerância com o aumento da concentração de Zn (0, 1, 5 e 10 μ M). A germinação de sementes, número total de raízes, comprimento da raiz, altura da parte aérea e relação raiz: parte aérea das plântulas foram medidos e integrados para calcular um índice de tolerância ao Zn para cada cultura.

De acordo com a bibliografia a alface é sensível ao Mn, mas apesar de ter havido uma redução significativa do índice de tolerância, a partir dos 350 μ M as plântulas parecem ter tolerado melhor este PTE, até mesmo para concentrações elevadas.

A partir dos 25 μ M as plântulas foram significativamente menos tolerantes ao As e ao Cd, o que significa que para baixas concentrações verifica-se uma redução do índice de tolerância a estes contaminantes, como seria de esperar, uma vez que se tratam de elementos tóxicos.

Com a adição de Cd o índice de tolerância reduziu-se mais de metade para 50 μ M, enquanto que noutros estudos em alface para 1000 μ M de Cd obteve-se um índice de tolerância de 68 %, 75 % e 91 % para as cultivares Vanda, Lídia e Stela, respetivamente, sendo as duas primeiras mais afetadas pelo PTE e a última mais tolerante. Esta redução de biomassa, pela toxicidade de Cd, poderá ser uma consequência direta da inibição da síntese de clorofila e fotossíntese (Nogueira *et al.* 2011).

Com a adição de As houve uma redução do índice de tolerância para metade entre 100 e 150 μ M. Abedin & Meharg (2002) também verificaram um decréscimo no índice de tolerância de sementes de arroz para concentrações crescentes de arsenato. Nesse estudo o índice de tolerância calculado foi baseado no comprimento da raiz. O índice de tolerância da raiz diminuiu 21, 44, 72, 86 e 89 % a 3,6; 7,2; 14,4; 28,8 e 57,6 μ M de arsenato.

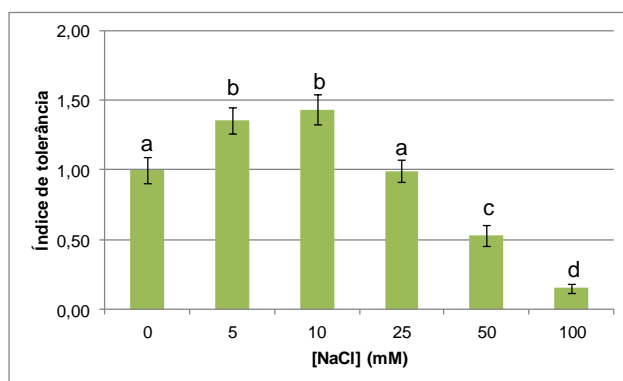


Figura 7 - Índice de tolerância das plântulas de alface para diferentes concentrações de NaCl (mM).

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) dos valores do índice de tolerância, para as diferentes concentrações de NaCl. As barras de erro indicam os valores de desvio padrão.

Como é possível observar pela figura 7, as plântulas apresentaram uma elevada tolerância até 25 mM e verificou-se uma redução de quase 50% do índice de tolerância para uma concentração de 50 mM de NaCl. A tolerância ao sal foi definida de diferentes maneiras por diversos autores. De acordo com Mengel & Kirkby (2001), no que respeita à produção de culturas, as plantas são tolerantes ao sal até que ocorra uma redução do crescimento de 50%.

4.2 Resultados dos ensaios de rega

4.2.1 Germinação das sementes

O tempo de germinação foi entre 3 e 12 dias, não tendo sido por isso homogênea. Na figura 8 é possível visualizar a germinação das sementes de alface em turfas. Nas figuras em anexo A7, A8, A9 e A10 são apresentadas as imagens das plantas recolhidas para as determinações analíticas nos ensaios com Cd, As, Cu e NaCl, respetivamente.

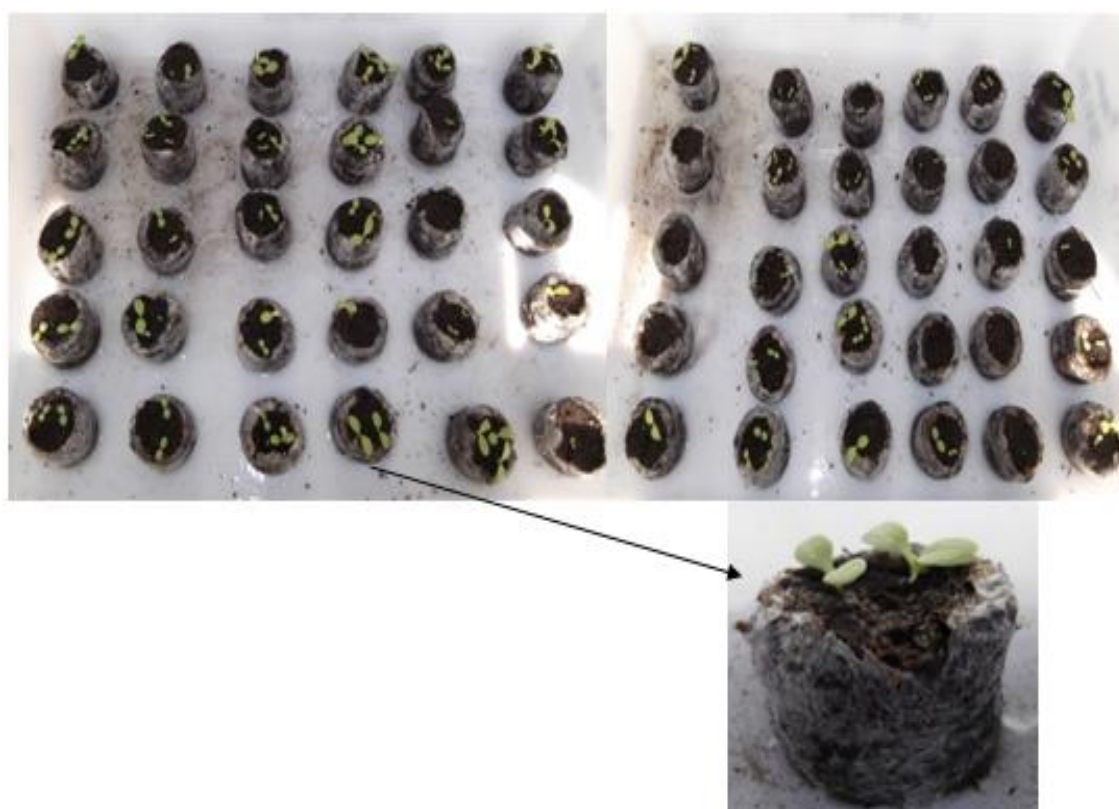


Figura 8 - Germinação de plantas de alface em turfas.

4.2.2 Efeito dos PTE e do NaCl nas propriedades das plantas

As propriedades das plantas avaliadas foram o número de folhas, a biomassa e o teor de matéria seca.

4.2.2.1 Número de folhas

Na figura 9 está representado o número médio de folhas das plantas para o ensaio de rega com Cd, As, Cu e NaCl, com aplicação de solução contaminada com 50 μM Cd, 50 μM As, 100 μM Cu e 25 mM NaCl.

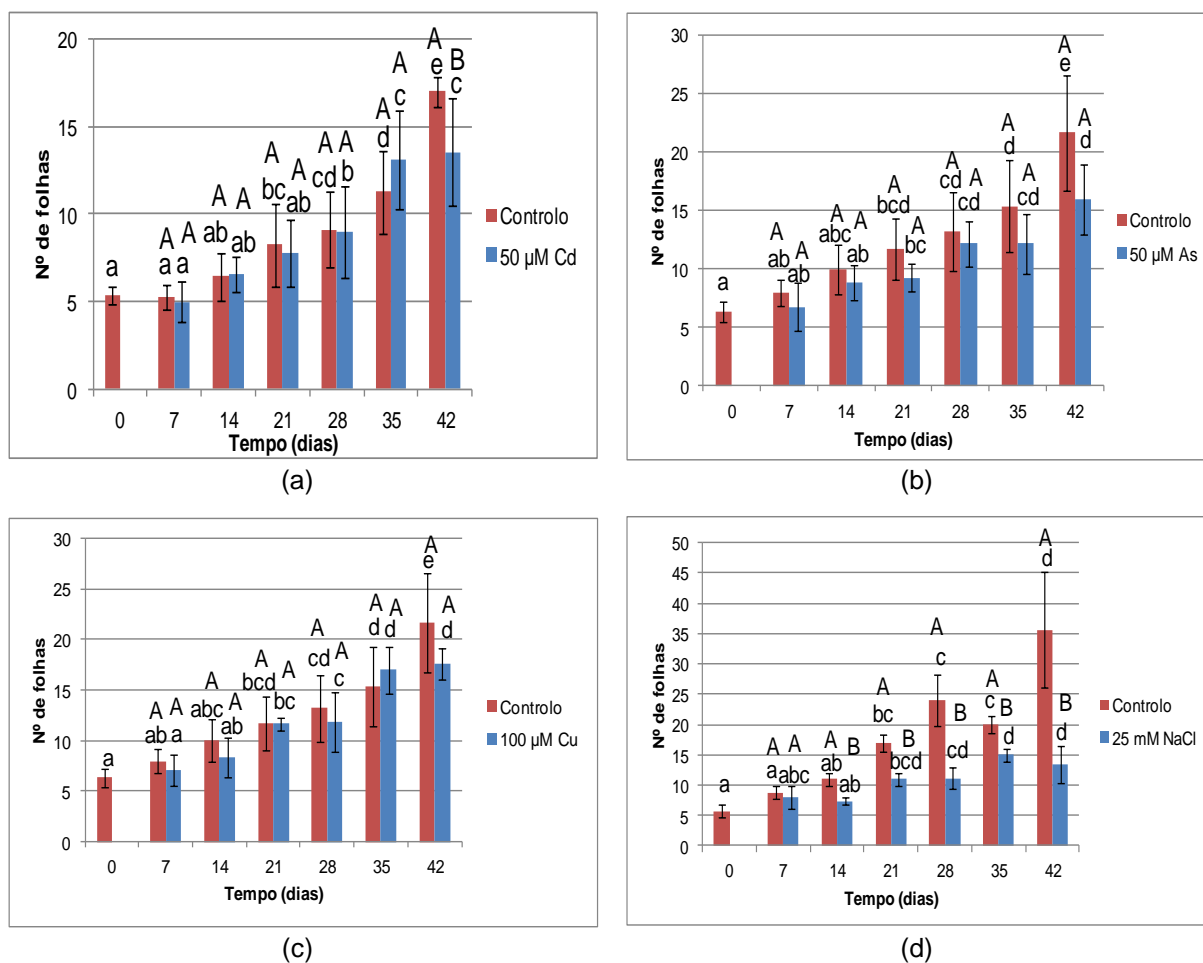


Figura 9 - Número médio de folhas de alface em plantas controle e contaminadas por rega com solução contendo 50 μM de Cd (a), 50 μM de As (b), 100 μM de Cu (c) e 25 mM de NaCl (d) durante 42 dias.

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas concentrações de PTE ou de NaCl para um dado dia. As barras de erro indicam os valores de desvio padrão.

Através da figura 9 observa-se que houve uma tendência para o aumento do número de folhas por planta em todos os ensaios, uma vez que esta se encontra em fase de desenvolvimento.

No ensaio com Cd, apenas no último dia existiram diferenças significativas no número de folhas por planta entre o controlo e as plantas contaminadas, no ensaio com Cu e As, verifica-se que não houve diferenças significativas entre as plantas controlo e contaminadas para nenhum dos dias, pelo que a aplicação destes dois PTE não teve influência neste parâmetro. No caso do ensaio com NaCl, as plantas contaminadas apresentaram um número de folhas significativamente menor às plantas controlo logo a partir do dia 14.

4.2.2.2 Biomassa

Na figura 10 é apresentado o gráfico da variação média da biomassa de plantas de alface para o ensaio de rega com Cd, As, Cu e NaCl. Este parâmetro é apenas relativo à parte aérea da planta dada a dificuldade em separar-se as raízes das turfas.

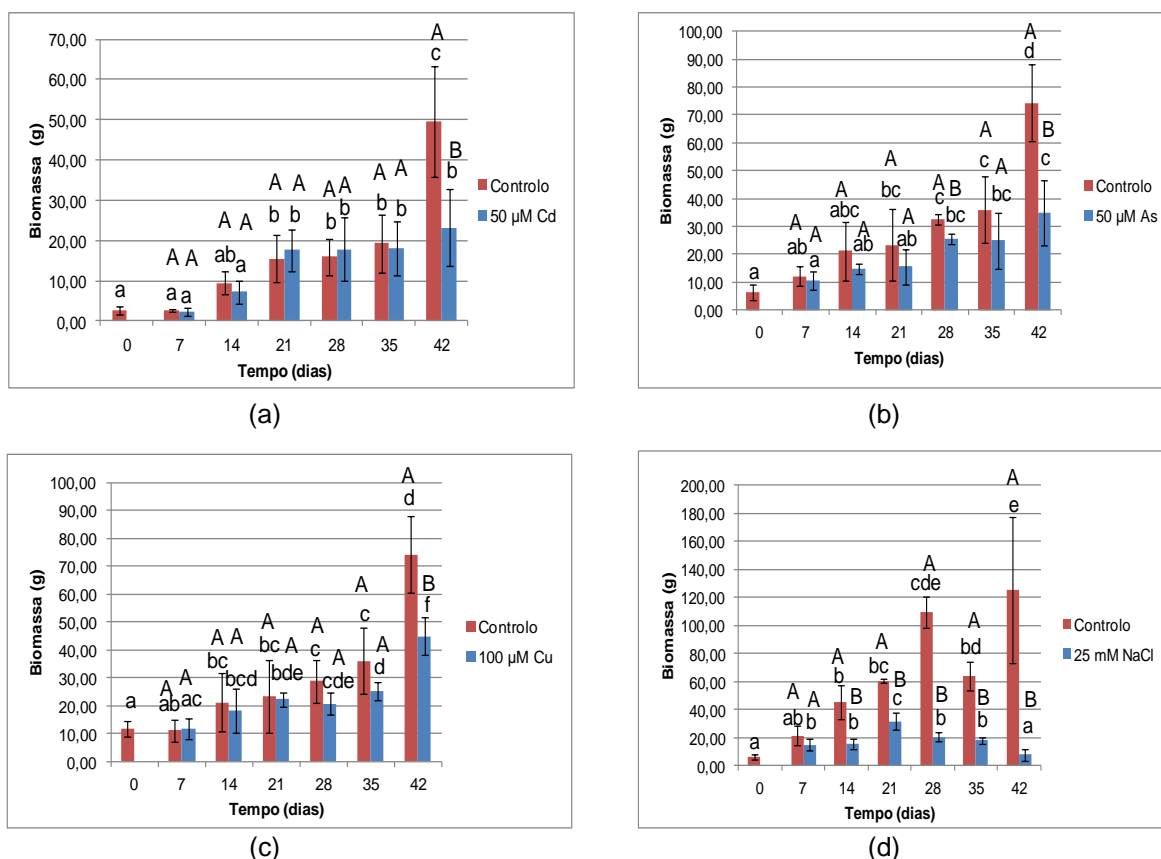


Figura 10 - Variação média da biomassa (g) de plantas controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 μ M de Cd (a), 50 μ M de As (b), 100 μ M de Cu (c) e 25 mM de NaCl (d) durante 42 dias.

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas concentrações de PTE ou de NaCl para um dado dia. As barras de erro indicam os valores de desvio padrão.

Na figura 10 verifica-se que houve uma tendência para o aumento da biomassa ao longo do tempo tanto nas plantas controlo como contaminadas, no ensaio com Cd, As e Cu. No caso do ensaio com NaCl, houve um aumento da biomassa das plantas contaminadas apenas até ao dia 21. No ensaio com Cd e Cu apenas se verificaram diferenças significativas na biomassa das plantas controlo e contaminadas no último dia, pelo que se poderia prolongar o tempo de exposição de modo a analisar se essa diferença continuaria ou se seria apenas devido à elevada heterogeneidade das amostras. No ensaio com As as diferenças de biomassa entre as plantas controlo e contaminadas ocorreram nos dias 28 e 42, enquanto que no ensaio com NaCl essas diferenças verificaram-se logo a partir do dia 14, verificando-se desta forma que a salinidade afetou fortemente este parâmetro. Já Mengel & Kirkby (2001) referem que a acumulação de sal no solo conduz a um pobre crescimento das culturas.

4.2.2.3 Teor de matéria seca

No quadro 3 é apresentada a variação do teor de matéria seca para o ensaio de rega com Cd, As, Cu e NaCl.

Quadro 3 - Teor de matéria seca (%) (MS (%)) de folhas de alface de plantas controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 µM de Cd, 50 µM de As, 100 µM de Cu e 25 mM de NaCl durante 42 dias.

		Tempo (dias)						
		0	7	14	21	28	35	42
Teor de matéria seca para ensaio de rega com Cd, $\bar{x} \pm \sigma$ (%)								
Controlo	5,80±1,00	7,53±1,29 abc A	6,29±0,16 ac A	7,02±0,70 abc A	8,44±0,51 bd A	8,41±0,23 bd A	8,14±0,56 cd A	
[Cd] = 50 µM	a	6,85±0,22 ab A	5,96±0,13 a A	6,57±0,13 ac A	8,31±0,71 bc A	8,49±0,76 b A	8,28±0,61 bc A	
Teor de matéria seca para ensaio de rega com As, $\bar{x} \pm \sigma$ (%)								
Controlo	5,97±0,35	5,49±0,18 a A	6,61±0,23 a A	6,58±0,51 a A	8,43±0,38 b A	8,99±0,39 b A	10,28±0,67 c A	
[As] = 50 µM	a	5,85±0,47 a A	7,82±1,74 ab A	7,18±0,49 ab A	8,16±0,51 ab A	9,43±1,08 bc A	11,19±1,50 c A	
Teor de matéria seca para ensaio de rega com Cu, $\bar{x} \pm \sigma$ (%)								
Controlo	5,97±0,35 a	5,49±0,18 a A	6,61±0,23 a A	6,58±0,51 a A	8,43±0,38 b A	8,99±0,39 b A	10,28±0,67 c A	
[Cu] = 100 µM	5,97±0,35 ab	5,58±0,21 a A	6,85 ±0,57 ab A	6,38±0,52 ab A	7,86±0,94 b A	10,21±0,24 c B	11,2±1,69 c A	
Teor de matéria seca para ensaio de rega com NaCl, $\bar{x} \pm \sigma$ (%)								
Controlo	5,86±0,45	6,3±0,89 a A	6,25±0,45 a A	9,68±0,12 b A	9,6±0,77 b A	9,52±0,22 b A	9,43±0,67 b A	
[NaCl] =25 mM	a	7,49±0,17 b A	8,08±0,77 b B	10,17±0,59 c A	10,27±0,21 c A	11,89±0,34 d B	10,31±0,59 c B	

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas concentrações de PTE ou de NaCl para um dado dia.

Pelo quadro 3 verifica-se que houve uma tendência para o aumento do teor de matéria seca em todos os ensaios, tanto para as plantas controlo como para as plantas contaminadas. No ensaio com Cd e As não houve diferenças significativas no teor de matéria seca entre as plantas contaminadas e controlo, pelo que a exposição a estes PTE não teve influência neste parâmetro. Ramos *et al.* (2002) não verificaram diferenças significativas no peso seco de alfaces controlo e expostas a concentrações de 0,89 e 8,9 μM de Cd, em ensaios em hidroponia.

Gräfe (2000) também não observou diferenças significativas no peso seco entre as plantas de alface controlo e contaminadas com diferentes concentrações de As (0,06 mM, 0,03 mM e 0,01 mM).

No ensaio com Cu, apenas no dia 35 as plantas contaminadas apresentaram um teor de matéria seca significativamente superior às plantas controlo. Já Martins & Mourato (2006) verificaram um aumento no teor de matéria seca em folhas de planta de tomate ao longo do tempo, mais evidente para elevadas concentrações de Cu e para tempos mais longos de exposição a excesso de Cu, quando comparado com as plantas controlo.

No ensaio com NaCl, apesar do teor de matéria seca ter sido sempre superior ao controlo, apenas nos dias 14, 35 e 42 é que essas diferenças foram significativas. Estudos em alface mostraram que o aumento da concentração salina na solução nutritiva (0, 10, 20 e 30 mM) levou a um aumento da percentagem de peso seco (Tesi *et al.*, 2003).

4.2.3 Efeitos dos PTE na clorofila

4.2.3.1 Curva de correlação entre o valor obtido pelo método *Hansatech* e o teor de clorofila medida no espectrofotómetro

Na figura 11 está representada a correlação entre o valor obtido pelo método *Hansatech* e o teor de clorofila medida no espectrofotómetro.

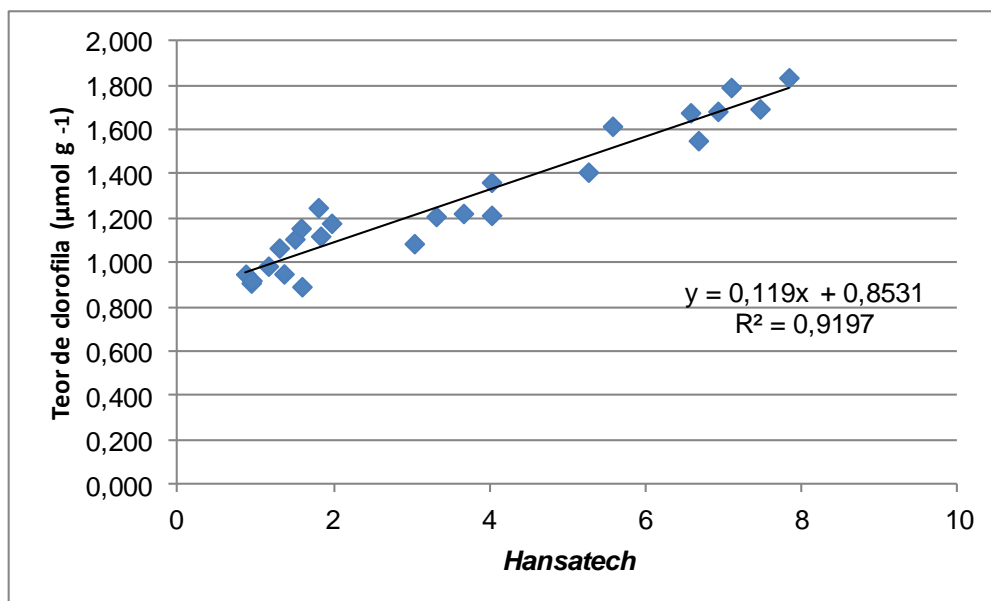


Figura 11 - Curva de correlação entre o valor obtido pelo método *Hansatech* e o teor de clorofila medido no espectrofotómetro. $y = 0,119x + 0,8531$; $R^2 = 0,9197$.

Através da figura 11 verifica-se uma linearidade da relação entre as duas metodologias. Apesar da determinação do teor de clorofila por espectrofotometria ser mais objetiva, as determinações através do método com o aparelho *Hansatech* permitem utilizar um número mais elevado de repetições, uma vez que se trata de um método não destrutivo, sendo por isso mais representativo. Esta correlação permite uma estimativa do teor de clorofila através de um método mais expedito e não destrutivo, e assim é possível acompanhar a evolução da cor das folhas ao longo do tempo de desenvolvimento. Desta forma, e devido à linearidade obtida, apenas se mediu a clorofila pelo método não destrutivo para as amostras recolhidas semanalmente de cada ensaio.

4.2.3.2 Quantificação da clorofila- *Hansatech*

No gráfico seguinte (figura 12 A e B) estão representadas as variações adimensionais do teor de clorofila, medido com o aparelho *Hansatech* em duas zonas da folha para o ensaio de rega com Cd, As, Cu e NaCl.

Pela observação da figura 12 (A e B) verifica-se, em todos os ensaios, que o teor de clorofila foi menor na zona 1 do que na zona 2.

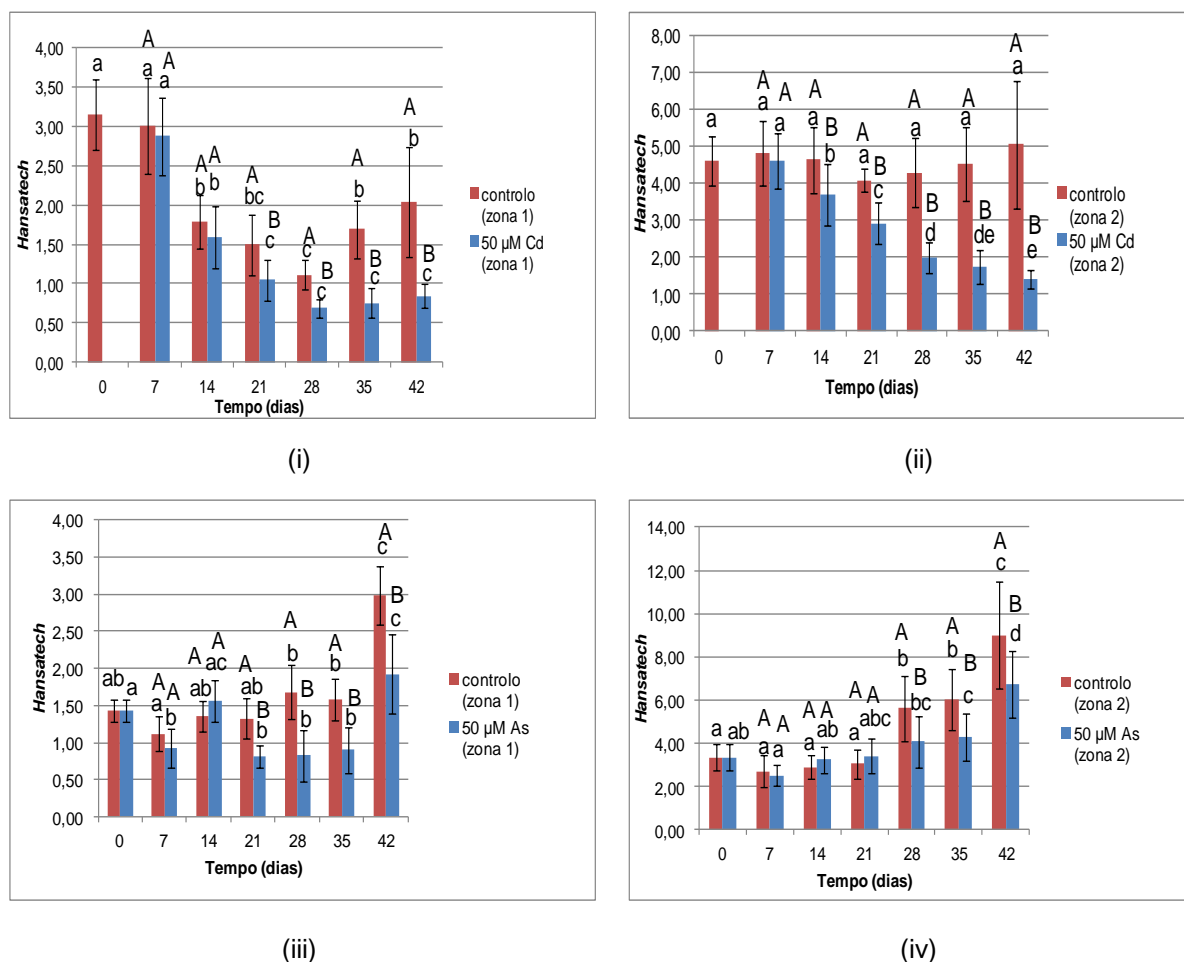


Figura 12A -Teor médio de clorofila (unidades arbitrárias),na zona 1 e zona 2 das folhas de alface controle e contaminadas por rega com solução contendo 50 µM Cd, 50 µM As, durante 42 dias.

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas concentrações de PTE para um dado dia. As barras de erro indicam os valores de desvio padrão.

Para o ensaio de rega com Cd, na zona 1, as plantas contaminadas apresentaram valores significativamente inferiores às plantas controle a partir do dia 21. Na zona 2, verificou-se a partir do dia 14 um decréscimo significativo do teor de clorofila das plantas contaminadas quando comparadas com as do controle, pelo que a exposição ao Cd afetou negativamente este parâmetro. Apesar de se terem obtido valores de clorofila menores nas plantas contaminadas, não se observaram sintomas visíveis do efeito tóxico do Cd nas plantas, como cloroses. As alfaces contaminadas apenas apresentaram uma tonalidade ligeiramente mais clara, como é visível pela figura em anexo A7 nos dias 35 e 42. A alface é bastante tolerante a elevadas quantidades de Cd no solo, mesmo quando atinge concentrações de Cd muito elevadas. Quando uma planta é acumuladora deverá ter mecanismos que lhe permita tolerar o efeito tóxico. Lavres Junior *et al.* (2008) verificaram, em cultivares de alface que os valores de clorofila medidos em aparelho SPAD-502 aumentaram em

algumas cultivares para concentrações de Cd de 0,1 μM , relativamente ao controlo, 21 dias após o início dos tratamentos. Contudo para outras cultivares não se observaram efeitos da adição do metal.

No ensaio de rega com As, na zona 1, também as plantas contaminadas apresentaram valores no teor de clorofila significativamente inferiores ao controlo a partir do dia 21 na zona 1 e a partir do dia 28 na zona 2. A redução observada nos teores de clorofila demonstram que a adição de As influenciou negativamente o nível de clorofila, apesar de não se ter detetado sintomas visíveis do efeito tóxico do As nas plantas, como cloroses, como se pode observar na figura em anexo A8. A presença de As causa danos nas membranas dos tilacoides e também podem verificar-se outros efeitos tóxicos, como a diminuição do conteúdo de carotenoides e de clorofilas, bem como uma diminuição na fixação de CO_2 (Päivöke & Simola, 2001; Stoeva & Bineva, 2003; Stoeva *et al*, 2003). Shaibur *et al.* (2006) verificaram que para concentrações crescentes de As (0; 6,7; 13,4 μM) o teor de clorofila (SPAD) decresceu em plântulas de arroz, 14 dias após o tratamento.

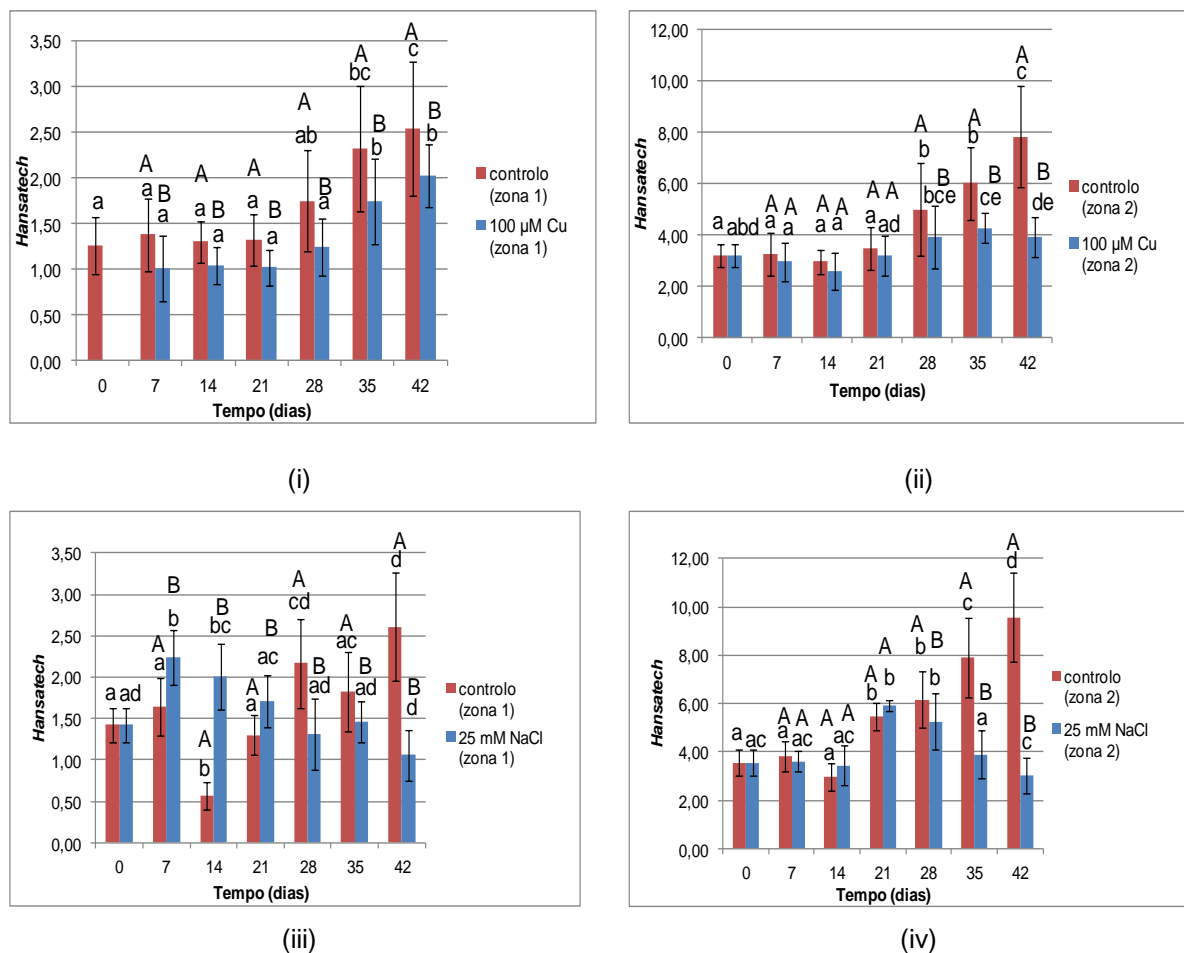


Figura 12B - Teor médio de clorofila (unidades arbitrárias), na zona 1 e zona 2 das folhas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 100 μM Cu, 25 mM NaCl, durante 42 dias.

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE ou de NaCl e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas concentrações de PTE ou de NaCl para um dado dia. As barras de erro indicam os valores de desvio padrão.

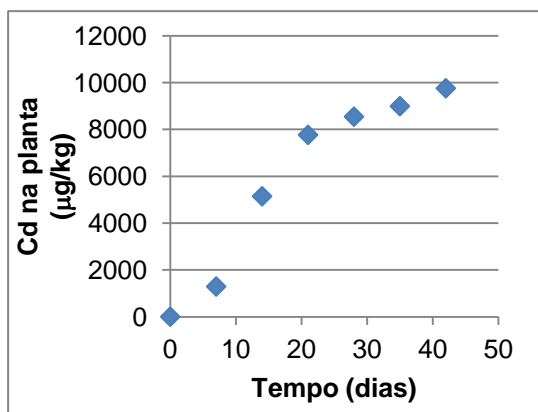
No ensaio de rega com Cu, na zona 1, as plantas contaminadas apresentaram teores de clorofila significativamente inferiores ao controlo logo a partir do dia 7 e na zona 2 tal verificou-se a partir do dia 28, pelo que a aplicação da solução de Cu teve uma influência negativa neste parâmetro. Também não foi visível o efeito tóxico do Cu nas alfaces. As alfaces contaminadas apenas apresentaram uma tonalidade ligeiramente mais clara para o dia 42, como se pode verificar pela figura em anexo A9. Martins & Mourato (2006) verificaram em plantas de tomate que os valores SPAD decresceram com o tempo e com concentrações crescentes de Cu, mostrando que o conteúdo de clorofila foi muito afetado pela toxicidade induzida por Cu, tendo havido diferenças significativas nas medições SPAD após 2 dias para as soluções nutritivas que continham 0,15 mM de Cu ou mais.

No ensaio de rega com NaCl, para a zona 1, até ao dia 21 as plantas contaminadas apresentaram teores de clorofila significativamente superiores às plantas controlo, sendo que a partir do dia 28 a situação inverteu-se. Na figura em anexo A10 é visível que as plantas contaminadas apresentaram uma tonalidade mais clara para o dia 14, no dia 28 algumas folhas já estavam amarelas e no dia 35 e 42 já se observaram folhas murchas. Na zona 2 da folha o teor de clorofila das plantas contaminadas foi significativamente menor ao das plantas controlo a partir do dia 28. Huang *et al.* (2006) verificaram um decréscimo significativo do teor de clorofila (SPAD) em 11 génotipos de cevada contaminados com 50 mM de NaCl, 20 dias após o tratamento.

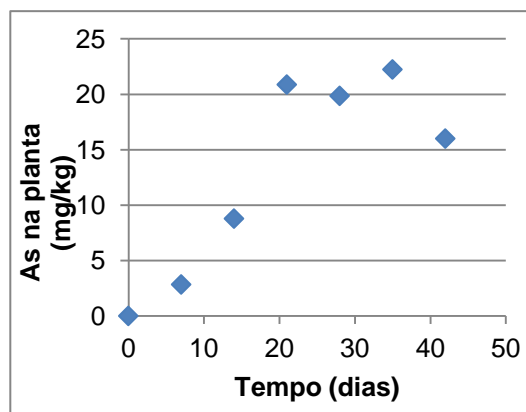
Desta forma a contaminação das plantas com PTE ou NaCl afetou a formação de clorofila.

4.2.4 Análise dos elementos minerais

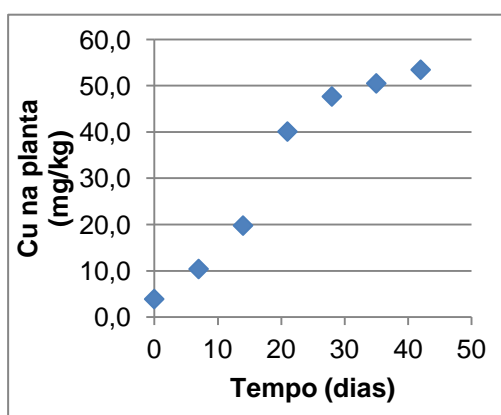
Para cada uma das modalidades do ensaio de rega, em que as plantas foram contaminadas com Cd, As, Cu e NaCl, foi avaliada a influência da aplicação de cada um dos PTE e NaCl nos restantes minerais da planta; os minerais estudados foram o Cd, As, Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca. As concentrações dos elementos mencionados para todos os ensaios de rega estão apresentados nos quadros 4, 5, 6 e 7. Em todos os quadros analisou-se a influência dos PTE e NaCl nos minerais. Na figura 13 está indicada a acumulação na planta, ao longo do tempo, de cada um dos PTE aplicados, bem como de Na para o ensaio de NaCl. Como se pode observar pela figura 13, houve uma acumulação dos PTE e de Na na planta ao longo do tempo para os respetivos ensaios.



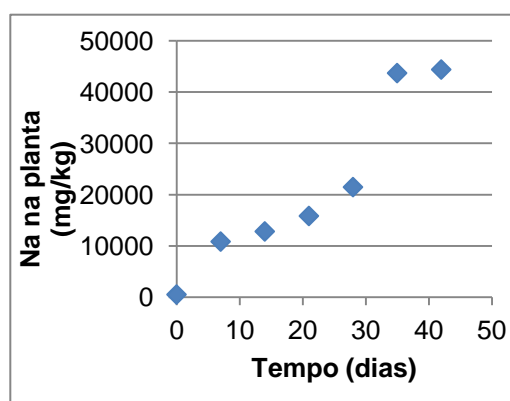
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 13 - Acumulação na planta, ao longo do tempo, de cada um dos PTE aplicados e de NaCl: aplicação de Cd (a), aplicação de As (b), aplicação de Cu (c), aplicação de NaCl (d).

Quadro 4 - Teor de Cd ($\mu\text{g kg}^{-1}$ MS); Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca (mg kg^{-1} MS), em folhas de alface de plantas controle e contaminadas por rega com solução contendo 50 μM de Cd.

Ensaio de rega com Cd	Tempo (Dias)						
	0	7	14	21	28	35	42
Teor de Cd nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$ MS)							
[Cd]= 50 μM	0,0 \pm 0,0 a	1290,3 \pm 103,9 a	5145,8 \pm 512,4 b	7766,7 \pm 821,0 c	8543,6 \pm 850,6 cd	8992,6 \pm 155,1 cd	9757,3 \pm 1177,7 d
Teor de Na nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controlo	686,1 \pm 7,4 ae	1434,5 \pm 82,8 b A	1423,8 \pm 16,1 b A	1115,0 \pm 24,1 c A	794,5 \pm 8,3 d A	720,9 \pm 29,9 de A	610,4 \pm 10,5 a A
[Cd]= 50 μM	686,1 \pm 7,4 a	998,6 \pm 18,5 b B	1013,5 \pm 6,9 b B	853,5 \pm 62,8 c B	583,5 \pm 6,0 d B	570,6 \pm 12,5 de B	497,7 \pm 23,7 e B
Teor de K nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controlo	83494,0 \pm 9793,1 a	83354,5 \pm 1887,9 a A	80308,2 \pm 611,9 ab A	76523,9 \pm 1532,9 abc A	69335,0 \pm 1140,4 bc A	65756,4 \pm 832,5 c A	67757,4 \pm 2745,1 c A
[Cd]= 50 μM		87441,5 \pm 2087,6 a A	81634,6 \pm 1418,1 a A	68611,2 \pm 1855,7 b B	61708,3 \pm 1459,9 bc B	56840,8 \pm 1241,6 cd B	60271,3 \pm 1188,4 bd B
Teor de Mg nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controlo	5772,7 \pm 41,2 a	7886,9 \pm 87,7 b A	8085,6 \pm 54,8 bc A	8105,1 \pm 0,2 bc A	7201,7 \pm 253,2 d A	8508,4 \pm 160,9 c A	9427,9 \pm 347,1 e A
[Cd]= 50 μM		7745,6 \pm 106,8 b A	8679,0 \pm 87,7 c B	8152,5 \pm 68,1 d A	7052,2 \pm 54,6 e A	7345,6 \pm 77,9 e B	8453,6 \pm 260,8 cd B
Teor de Zn nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controlo	42,1 \pm 0,3 a	60,6 \pm 3,1 bc A	53,0 \pm 0,3 ab A	57,2 \pm 0,6 bc A	68,7 \pm 5,4 c A	92,1 \pm 6,1 d A	90,0 \pm 3,2 d A
[Cd]= 50 μM		52,6 \pm 0,5 ab B	69,2 \pm 2,6 cd B	65,1 \pm 1,6 cd B	62,0 \pm 9,9 bc A	68,5 \pm 1,5 cd B	76,3 \pm 2,3 d B
Teor de Mn nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controlo	157,2 \pm 3,5 a	225,5 \pm 19,7 b A	239,0 \pm 6,8 bc A	258,8 \pm 2,3 c A	248,5 \pm 9,6 bc A	312,1 \pm 6,6 d A	337,0 \pm 6,1 d A
[Cd]= 50 μM		228,0 \pm 14,9 b A	258,2 \pm 7,2 bc B	273,5 \pm 15,9 c A	264,6 \pm 16,7 cd A	234,5 \pm 13,3 bd B	233,7 \pm 13,2 bd B
Teor de Fe nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controlo	74,6 \pm 9,9 a	73,1 \pm 5,4 a A	68,7 \pm 1,4 a A	61,6 \pm 2,0 ab A	44,2 \pm 4,1 cd A	52,2 \pm 1,7 bc A	35,1 \pm 8,2 d A
[Cd]= 50 μM		68,5 \pm 9,1 a A	61,6 \pm 4,8 ab A	48,7 \pm 0,8 b B	28,3 \pm 4,7 c B	10,3 \pm 7,1 d B	13,9 \pm 1,4 cd B
Teor de Cu nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controlo	5,5 \pm 1,3 a	4,0 \pm 0,3 ab A	4,1 \pm 0,2 ab A	3,5 \pm 0,6 b A	4,0 \pm 0,8 ab A	3,8 \pm 0,6 ab A	3,8 \pm 0,4 ab A
[Cd]= 50 μM		3,9 \pm 1,1 ab A	3,5 \pm 0,6 ab A	3,0 \pm 0,3 bc A	2,5 \pm 0,6 bcd A	0,8 \pm 0,4 d B	1,2 \pm 0,4 cd B
Teor de Ca nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controlo	2709,1 \pm 52,6 a	3763,0 \pm 92,1 b A	4201,1 \pm 42,0 c A	4344,8 \pm 75,4 c A	3750,2 \pm 139,8 b A	3804,2 \pm 172,3 bd A	4079,7 \pm 83,7 cd A
[Cd]= 50 μM		3855,8 \pm 63,5 b A	4795,0 \pm 87,0 c B	4427,1 \pm 43,8 d A	4042,4 \pm 113,4 be B	4186,1 \pm 79,9 e B	4589,2 \pm 117,4 cd B

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas concentrações de PTE para um dado dia.

Para o ensaio de rega com Cd, não foi detetado teor de Cd nas amostras testemunhas, o que quer dizer que se encontra em concentrações abaixo do limite de deteção como era previsto, dado que não foi aplicado à solução nutritiva. Relativamente às amostras contaminadas verificou-se um aumento nos níveis de Cd com o tempo de exposição. A concentração máxima de Cd foi de 0,40 mg kg⁻¹ PF (peso fresco) no dia 42, sendo superior ao valor estabelecido por lei para produtos hortícolas de folha.

Quanto ao teor de Na nas folhas, verificou-se que as amostras contaminadas com Cd apresentaram um teor de Na significativamente inferior às amostras controlo, o que mostra que a acumulação de Cd interferiu na absorção deste nutriente.

Relativamente ao teor de K, as amostras contaminadas apresentaram valores significativamente inferiores aos das amostras controlo a partir do dia 21. Desta forma também a acumulação de Cd interferiu na absorção de K. Zornoza *et al* (2002) verificaram que as folhas de tremoceiro branco contaminadas com 18 µM e 45 µM Cd apresentaram um teor de K significativamente inferior ao das amostras controlo ao fim de 35 dias.

O teor de Mg foi significativamente inferior nas amostras controlo para o dia 14, situação que se inverteu nos dias 35 e 42. Pelo que para um tempo de exposição maior a aplicação de Cd afetou negativamente a concentração de Mg. Zornoza *et al* (2002) verificaram que as folhas de tremoceiro branco contaminadas com 18 µM e 45 µM Cd apresentaram um teor de Mg significativamente inferior ao das amostras controlo, ao fim de 35 dias. Desta forma verifica-se que a acumulação de Cd interferiu na assimilação, transporte e utilização de Mg (di Toppi & Gabrielli, 1999).

Relativamente ao teor de Zn verificou-se uma diminuição significativa nas amostras contaminadas relativamente às amostras controlo, a partir do dia 35, pelo que a exposição ao Cd afetou negativamente a absorção de Zn. Ramos *et al*. (2002) verificaram que as concentrações de Zn nas folhas de alface decresceram significativamente pela adição de Cd na solução nutritiva, 16 dias após o tratamento e para concentrações de 0,89 µM e 8,9 µM de Cd.

Pelo quadro 4 observa-se uma redução significativa do teor de Mn nas amostras contaminadas fase às amostras controlo a partir do dia 35, pelo que a aplicação de Cd afetou negativamente a absorção deste elemento. Zornoza *et al* (2002) verificaram que as folhas de tremoceiro branco contaminadas com 18 µM e 45 µM Cd apresentaram um teor de Mn significativamente inferior ao das amostras controlo, ao fim de 35 dias.

Quando ao teor de Fe, este foi significativamente inferior nas amostras contaminadas a partir do dia 21. Ramos *et al* (2002) verificaram que amostras contaminadas com Cd apresentaram teores de Fe significativamente inferiores aos das amostras controlo em folhas alfaces, 16 dias após o tratamento e para concentrações de 0,89 µM e 8,9 µM de Cd.

O teor de Cu foi significativamente inferior nas amostras contaminadas a partir do dia 35 relativamente às amostras controlo. Ramos *et al* (2002) verificaram que amostras contaminadas com Cd apresentaram teores de Cu significativamente inferiores aos das amostras controlo em alfaces, 16 dias após o tratamento e para concentrações de 0,89 µM e 8,9 µM de Cd.

Tal como foi referido anteriormente a absorção de iões Cd parece estar em competição para o mesmo transportador transmembranar com nutrientes, tais como o K, Mg, Zn, Mn, Fe e Cu, o que poderá justificar os resultados obtidos.

No quadro 4 observa-se que o teor de Ca nas amostras controlo foi significativamente inferior ao das amostras contaminadas para os dias 14,28,35 e 42. Wang *et al.*(1992) sugeriram que a forte interação entre o Ca e a parede celular fosse importante no fornecimento suficiente de Ca de modo a manter a integridade da membrana plasmática. Em situações de stresse induzido por Cd, um aumento da concentração de Ca constitui um possível mecanismo para reduzir os efeitos tóxicos do Cd.

Quadro 5- Teor de As, Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca (mg kg^{-1} MS), em folhas de alface de plantas controle e contaminadas por rega com solução contendo 50 μM de As.

Ensaio de rega com As	Tempo (Dias)						
	0	7	14	21	28	35	42
Teor de As nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
[As]= 50 μM	0,0 \pm 0,0 a	2,8 \pm 1,0 ab	8,8 \pm 1,0 bc	20,9 \pm 1,3 d	19,9 \pm 2,3 d	22,2 \pm 5,0 d	16,0 \pm 2,5 cd
Teor de Na nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controle	1019,5 \pm 103,0 a	710,3 \pm 103,2 b A	481,7 \pm 120,2 c A	302,2 \pm 13,0 cd A	402,3 \pm 115,8 c A	48,1 \pm 14,3 e A	111,0 \pm 35,3 de A
[As]= 50 μM	a	766,3 \pm 79,3 ab A	232,6 \pm 107,2 c A	487,4 \pm 13,7 bc B	441,8 \pm 68,3 c A	415,8 \pm 161,7 c B	292,5 \pm 38,8 c B
Teor de K nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controle	70468,5 \pm 931,0 a	74528,4 \pm 1565,3 bc A	75422,4 \pm 614,7 b A	71616,1 \pm 756,4 ac A	71071,2 \pm 1922,1 a A	70508,6 \pm 1020,9 a A	60016,1 \pm 438,5 d A
[As]= 50 μM	a	69054,2 \pm 2033,3 a B	51376,6 \pm 611,8 b B	57129,9 \pm 555,3 bc B	69505,3 \pm 781,6 a A	60583,4 \pm 3960,9 c B	57810,2 \pm 520,0 c B
Teor de Mg nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controle	9138,3 \pm 245,6 a	10000,5 \pm 768,7 a A	7641,7 \pm 282,8 b A	7883,3 \pm 455,8 b A	9163,5 \pm 29,4 a A	9307,7 \pm 531,7 a A	9464,4 \pm 51,7 a A
[As]= 50 μM	a	9839,1 \pm 364,7 b A	7065,7 \pm 380,1 c A	8359,3 \pm 261,5 d A	8215,3 \pm 217,8 d B	7497,2 \pm 117,9 ce B	7976,9 \pm 61,7 de B
Teor de Zn nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controle	54,2 \pm 7,5 a	69,9 \pm 11,0 a A	71,6 \pm 7,2 a A	95,9 \pm 4,0 b A	110,4 \pm 3,9 b A	102,6 \pm 7,9 b A	96,6 \pm 6,6 b A
[As]= 50 μM	a	49,6 \pm 4,9 a B	48,1 \pm 3,6 a B	56,7 \pm 3,0 a B	69,2 \pm 6,3 a B	67,0 \pm 12,9 a B	55,6 \pm 10,3 a B
Teor de Mn nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controle	159,7 \pm 1,8 a	210,6 \pm 4,3 b A	177,6 \pm 3,1 ac A	180,5 \pm 5,5 c A	183,4 \pm 2,0 c A	183,1 \pm 13,4 c A	135,0 \pm 1,2 d A
[As]= 50 μM	ab	166,6 \pm 5,1 a B	116,3 \pm 0,6 c B	159,1 \pm 0,5 ab B	189,5 \pm 7,2 d A	145,3 \pm 14,9 b B	104,8 \pm 2,3 c B
Teor de Fe nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controle	61,5 \pm 1,7 a	70,6 \pm 1,8 b A	53,7 \pm 3,6 ac A	58,3 \pm 6,2 ac A	61,1 \pm 0,9 a A	50,5 \pm 3,3 c A	39,4 \pm 2,5 d A
[As]= 50 μM	a	66,3 \pm 3,4 a A	47,5 \pm 1,4 b B	46,9 \pm 2,3 b B	70,8 \pm 4,9 a B	62,8 \pm 6,8 a B	45,0 \pm 1,6 b B
Teor de Cu nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controle	3,9 \pm 0,4 a	4,2 \pm 0,3 a A	4,1 \pm 0,4 a A	3,8 \pm 0,4 a A	5,3 \pm 0,4 b A	4,6 \pm 0,5 ab A	3,9 \pm 0,2 a A
[As]= 50 μM	ac	3,2 \pm 0,6 ab A	2,0 \pm 0,3 b B	2,7 \pm 0,1 ab B	5,1 \pm 0,5 c A	3,8 \pm 0,7 ac A	4,1 \pm 0,8 ac A
Teor de Ca nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg^{-1} MS)							
Controle	3975,8 \pm 80,3 ab	4554,2 \pm 450,1 b A	3474,2 \pm 146,5 b A	4296,4 \pm 837,5 ab A	4360,7 \pm 146,6 ab A	4619,2 \pm 111,0 a A	4262,6 \pm 83,3 ab A
[As]= 50 μM	a	4118,2 \pm 102,8 a A	3156,6 \pm 281,6 b A	4161,8 \pm 83,5 a A	4350,8 \pm 169,5 a A	4019,7 \pm 140,0 a B	4083,1 \pm 63,6 a B

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas concentrações de PTE para um dado dia.

No quadro 5, como se pode verificar, não foi detetado teor de As nas amostras testemunhas, o que quer dizer que se encontra em concentrações abaixo do limite de deteção como era previsto, dado que não foi aplicado à solução nutritiva. Relativamente às amostras contaminadas verificou-se um aumento nos níveis de As até ao dia 21, mantendo-se estável a partir daí. A concentração máxima de As foi de $0,91 \text{ mg kg}^{-1}$ PF no dia 35, sendo superior ao valor estabelecido por lei, na forma de arsenito de sódio, para produtos alimentares.

As amostras controlo apresentaram um teor de Na significativamente inferior ao das amostras contaminadas para o dia 21, 35 e 42.

O teor de K foi significativamente inferior nas amostras contaminadas para o dia 7,14,21,35 e 42, relativamente ao controlo, pelo que a aplicação de As afetou negativamente a concentração de K. Shaibur & Kawai (2010) verificaram um decréscimo significativo na concentração de K em espinafre mostarda Japonês contaminadas com $67 \mu\text{M}$ As, 14 dias após os tratamentos.

Pela análise do quadro 5 é possível afirmar que a contaminação das plantas de alface com As afetou negativamente o teor de Mg, tendo-se verificado uma redução significativa nas amostras contaminadas relativamente às amostras controlo a partir do dia 28. Shaibur & Kawai (2010) verificaram um decréscimo significativo na concentração de Mg em amostras de espinafre mostarda Japonês contaminadas com $67 \mu\text{M}$ As, 14 dias após os tratamentos. Na maioria dos casos, elevadas concentrações de Mg melhoram a qualidade nutricional das plantas, o que significa que a limitação da concentração de Mg nas folhas também limitou a qualidade nutricional (Shaibur & Kawai, 2010).

Pelo quadro 5 verifica-se que o teor de Zn foi sempre significativamente menor nas amostras contaminadas face às amostras controlo, pelo que a aplicação de As afetou negativamente o teor de Zn. Shaibur & Kawai (2010) verificaram que a concentração de Zn na parte aérea de espinafre mostarda Japonês, foi limitada por níveis de $67 \mu\text{M}$ de As quando comparado com o controlo, 14 dias após os tratamentos.

À exceção do dia 28, O teor de Mn foi significativamente inferior nas amostras contaminadas relativamente às amostras controlo, pelo que a adição de As influenciou negativamente o teor de Mn. Shaibur & Kawai (2010) verificaram que a concentração de Mn na parte aérea de espinafre mostarda Japonês foi limitada por níveis de $67 \mu\text{M}$ de As quando comparado com o controlo.

O teor de Fe foi significativamente inferior nas amostras contaminadas para o dia 14 e 21. Nos dias 28, 35 e 42, as amostras controlo apresentaram um teor de Fe significativamente inferior. Shaibur & Kawai (2010) verificaram que a concentração de Fe na parte aérea de espinafre mostarda Japonês foi limitada por níveis de $67 \mu\text{M}$ de As quando comparado com o controlo, o que limitou a qualidade nutricional de Fe, 14 dias após os tratamentos.

Apesar do teor de Cu ter sido sempre inferior nas amostras contaminadas, apenas nos dias 14 e 21 é que houve diferenças significativas relativamente às amostras controlo. Shaibur & Kawai (2010) verificaram que a toxicidade de As não afetou as concentrações de Cu nas folhas de espinafre mostarda Japonês, 14 dias após os tratamentos.

O teor de Ca foi significativamente inferior nas amostras contaminadas, relativamente ao controlo, a partir do dia 35. Shaibur & Kawai (2010) verificaram em plantas de espinafre mostarda Japonês que para uma concentração de 67 μM de As as concentrações de Ca foram limitadas, 14 dias após os tratamentos.

Quadro 6 - Teor de Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca (mg kg⁻¹ MS), em folhas de alface de plantas controle e contaminadas por rega com solução contendo 100 µM de Cu.

Ensaio de rega com Cu	Tempo (Dias)						
	0	7	14	21	28	35	42
Teor de Na nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg⁻¹ MS)							
Controle	1019,5±103,0	710,3±103,2 b A	481,7±120,2 c A	302,2±13,0 cd A	402,3±115,8 c A	48,1±14,3 e A	111,0±35,3 de A
[Cu]=100µM	a	692,3±19,5 b A	214,6±30,1 c B	233,3±77,0 c A	216,6±18,6 c A	54,6±12,7 d A	65,2±16,0 d A
Teor de K nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg⁻¹ MS)							
Controle	70468,5±931,0	74528,4±1565,3 bc A	75422,4±614,7 b A	71616,1±756,4 ac A	71071,2±1922,1 a A	70508,6±1020,9 a A	60016,1±438,5 d A
[Cu]=100µM	a	75705,9±1895,4 b A	70381,6±1159,0 a B	72319,9±236,9 ab A	80734,5±1090,3 c B	63826,6±2160,3 d B	61522,1±1475,7 d A
Teor de Mg nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg⁻¹ MS)							
Controle	9138,3±245,6 a	10000,5±768,7 a A	7641,7±282,8 b A	7883,3±455,8 b A	9163,5±29,4 a A	9307,7±531,7 a A	9464,4±51,7 a A
[Cu]=100µM	ae	10239,1±501,5 b A	7106,2±172,3 c B	7691,2±57,8 cd A	8552,7±345,9 ef B	8267,3±121,7 df B	9799,1±159,6 ab B
Teor de Zn nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg⁻¹ MS)							
Controle	54,2±7,5	69,9±11,0 a A	71,6±7,2 a A	95,9±4,0 b A	110,4±3,9 b A	102,6±7,9 b A	96,6±6,6 b A
[Cu]=100µM	a	68,4±5,8 ab A	73,5±7,2 bc A	90,2±10,6 cd A	91,4±4,2 d B	68,1±3,4 ab B	69,5±1,4 ab B
Teor de Mn nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg⁻¹ MS)							
Controle	159,7±1,8	210,6±4,3 b A	177,6±3,1 ac A	180,5±5,5 c A	183,4±2,0 c A	183,1±13,4 c A	135,0±1,2 d A
[Cu]=100µM	a	235,2±3,5 b B	186,7±5,7 c A	178,2±3,9 cd A	219,1±5,1 e B	172,3±0,8 ad A	179,7±7,9 cd B
Teor de Fe nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg⁻¹ MS)							
Controle	61,5±1,7	70,6±1,8 b A	53,7±3,6 ac A	58,3±6,2 ac A	61,1±0,9 a A	50,5±3,3 c A	39,4±2,5 d A
[Cu]=100µM	a	60,3±1,7 a B	49,3±0,4 bc A	48,8±2,3 bc A	54,5±2,3 ab B	43,1±7,6 c A	31,1±0,7 d B
Teor de Cu nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg⁻¹ MS)							
Controle	3,9±0,4	4,2±0,3 a A	4,1±0,4 a A	3,8±0,4 a A	5,3±0,4 b A	4,6±0,5 ab A	3,9±0,2 a A
[Cu]=100µM	a	10,4±0,6 b B	9,8±0,4 b B	40,1±1,4 c B	47,7±2,1 d B	50,5±0,4 de B	53,5±1,9 e B
Teor de Ca nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg⁻¹ MS)							
Controle	3975,8±80,3 ab	4554,2±450,1 a A	3474,2±146,5 b A	4296,4±837,5 ab A	4360,7±146,6 ab A	4619,2±111,0 a A	4262,6±83,3 ab A
[Cu]=100µM	acd	4820,5±277,2 b A	3495,2±335,4 c A	3618,8±189,5 cd A	4284,5±84,7 a A	4097,9±47,8 ad B	4467,6±35,4 ab B

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de PTE e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas concentrações de PTE para um dado dia.

No quadro 6 observa-se que apenas no dia 14 as amostras contaminadas com Cu apresentaram um teor de Na significativamente inferior ao das amostras controlo, pelo que a aplicação de Cu não afetou o teor de Na. Martins & Mourato (2006) também verificaram que não houve alterações significativas do teor de Na em folhas de plantas de tomate controlo e contaminadas com 0,1 mM de Cu, ao longo de 15 dias.

O teor de K foi significativamente inferior nas amostras contaminadas para o dia 14 e 35. Por outro lado as amostras controlo apresentaram um teor de K significativamente inferior ao das amostras contaminadas para o dia 28.

No dia 14, 28 e 35 o teor de Mg foi significativamente inferior nas amostras contaminadas. No dia 42 as amostras controlo apresentaram um teor de Mg significativamente inferior relativamente às amostras contaminadas. Martins & Mourato (2006) verificaram que o teor de Mg em folhas de plantas de tomate foi significativamente menor em plantas contaminadas com 0,1 mM de Cu ao décimo quinto dia, quando comparado com as plantas controlo.

Relativamente ao teor de Zn as amostras contaminadas apresentaram um teor significativamente inferior ao das amostras controlo a partir do dia 28, pelo que a adição de Cu influenciou negativamente o teor de Zn nas folhas. Tal como foi referido anteriormente, o Cu afeta o Zn ao ocupar preferencialmente os espaços de adsorção na raiz. Martins & Mourato (2006) verificaram que o teor de Mg em folhas de plantas de tomate foi significativamente menor em plantas contaminadas com 0,1 mM de Cu ao décimo quinto dia, quando comparado com as plantas controlo.

As amostras controlo apresentaram um teor de Mn significativamente inferior ao das amostras contaminadas para os dias 7, 28 e 42 pelo que o Cu aparenta estimular a absorção de Mn. Contudo, estudos em plantas de tremço amarelo indicam que a adição de 50 μM de Cu na solução nutritiva leva uma redução significativa do teor de Mn nas folhas (Mourato *et al.* 2009a).

Relativamente ao teor de Fe, este foi sempre inferior nas amostras contaminadas, mas apenas nos dias 7, 28 e 42 é que essas diferenças foram significativas. A aplicação de Cu afetou negativamente o teor de Fe. Tal como foi referido anteriormente, na presença de elevadas concentrações de Cu ocorre deficiência de Fe, dado que o Cu o substitui em diversas proteínas.

Quanto ao teor de Cu este foi significativamente inferior nas amostras controlo quando comparado com as amostras contaminadas para todos os dias, como seria de esperar, dado que este contaminante não foi aplicado à solução nutritiva das amostras controlo. A concentração máxima de Cu foi de 2,19 mg kg⁻¹ PF no dia 42, sendo inferior ao valor estabelecido por lei para alfaces.

No dia 35 verificou-se que o teor de Ca foi significativamente inferior nas amostras contaminadas e no dia 42 a situação inverteu-se. Martins & Mourato (2006) verificaram também que a aplicação de Cu não levou a alterações significativas no teor de Ca de plantas de tomate controlo e contaminadas com 0,1 mM de Cu, ao longo de 15 dias.

Quadro 7 - Teor de Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe, Cu e Ca (mg kg^{-1} MS), em folhas de alface de plantas controle e contaminadas por rega com solução contendo 25 mM de NaCl.

Ensaio de rega com NaCl	Tempo (Dias)						
	0	7	14	21	28	35	42
Teor de Na nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg ⁻¹ MS)							
Controlo	555,7±61,6 a	443,1±45,1 ab A	273,4±20,8 c A	297,9±43,2 c A	232,8±45,2 c A	254,7±53,3 c A	350,9±29,1 bc A
[NaCl]= 25mM		10881,9±2207,7 b B	12858,3±816,3 b B	15876,2±1284,1 bc B	21502,5±1267,5 c B	43735,9±1046,1 d B	44428,3±4487,7 d B
Teor de K nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg ⁻¹ MS)							
Controlo	73737,8±2925,0 a	65767,5±1298,1 b A	59569,5±995,7 c A	44355,9±216,9 d A	43817,1±2069,3 d A	47799,4±1468,4 d A	48045,0±803,5 d A
[NaCl]= 25mM		57719,8±696,1 b B	44779,5±704,2 c B	38604,1±1118,9 d B	42954,0±2245,5 cd A	49819,1±1825,7 e A	52987,2±1752,4 be B
Teor de Mg nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg ⁻¹ MS)							
Controlo	3789,7±21,0 a	3610,1±61,4 ab A	3289,6±117,7 abc A	2880,9±105,0 c A	3170,9±49,6 bc A	5027,9±282,9 d A	5073,4±328,0 d A
[NaCl]= 25mM		3331,4±115,5 bc B	3647,5±293,5 ab A	3203,0±176,7 c A	3475,4±37,3 abc B	4488,2±75,6 d B	4494,2±142,1 d B
Teor de Zn nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg ⁻¹ MS)							
Controlo	64,5±4,2 a	90,0±1,7 b A	119,4±2,0 c A	84,7±1,6 bd A	84,0±1,6 bd A	91,6±1,0 b A	81,3±5,2 d A
[NaCl]= 25mM		99,2±1,6 b B	128,8±11,9 c A	116,6±4,8 c B	95,7±2,3 b B	117,3±7,0 c B	116,9±2,0 c B
Teor de Mn nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg ⁻¹ MS)							
Controlo	218,7±9,6 a	235,3±3,5 a A	274,5±4,8 b A	161,6±10,0 c A	150,9±7,7 c A	169,8±4,8 c A	101,4±9,7 d A
[NaCl]= 25mM		198,9±7,6 b B	224,6±14,9 a B	170,4±3,8 c A	117,9±4,2 d B	105,1±2,9 d B	99,0±1,0 d A
Teor de Fe nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg ⁻¹ MS)							
Controlo	85,1±0,9 a	61,2±1,1 bc A	64,5±1,0 b A	51,4±0,5 d A	49,8±0,9 d A	51,2±5,2 d A	56,5±3,8 cd A
[NaCl]= 25mM		55,9±2,4 b B	56,3±7,2 b A	44,9±1,5 c B	42,9±0,6 c B	33,4±3,6 d B	30,4±1,9 d B
Teor de Cu nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg ⁻¹ MS)							
Controlo	7,1±0,4 a	4,6±0,4 bc A	5,0±0,3 bc A	4,5±0,8 bc A	5,0±0,2 bc A	5,4±0,4 b A	3,7±0,6 c A
[NaCl]= 25µM		7,9±0,4 a B	7,6±0,5 a B	7,1±0,3 ab B	7,5±0,6 a B	5,2±0,7 c A	6,0±0,5 bc B
Teor de Ca nas folhas, $\bar{x} \pm \sigma$ (mg kg ⁻¹ MS)							
Controlo	3732,6±79,2 a	3551,0±87,1 ab A	3299,1±84,1 b A	3251,0±165,2 b A	3602,4±203,4 ab A	5610,5±132,5 c A	5563,4±174,7 c A
[NaCl]= 25mM		3389,0±177,0 b A	3848,8±162,1 abc B	3399,1±136,1 ab A	4182,0±309,2 c A	4944,1±45,9 d B	4138,1±123,5 c B

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo para uma dada concentração de NaCl e as letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diversas concentrações de NaCl para um dado dia.

Através do quadro 7, observa-se um aumento no teor de Na ao longo do tempo para as amostras contaminadas. O teor de Na foi significativamente inferior nas amostras controle relativamente às amostras contaminadas com NaCl, como seria de esperar.

O teor de K foi significativamente inferior nas amostras contaminadas quando comparadas com o controle para o dia 7, 14 e 21. No dia 42 a situação inverteu-se. Segundo Mengel & Kirky (2001) o excesso de Na^+ sobre K^+ pode resultar em deficiência de K^+ . Higbie *et al.* (2010) verificaram em genótipos de algodão, que a adição de NaCl (200 mM) levou a um decréscimo do teor de K. Yousif *et al.* (2010) observaram um decréscimo significativo deste elemento em plantas de espinafre da Nova Zelândia contaminadas com 50 mM de NaCl, 21 dias após o início do tratamento.

O teor de Mg foi significativamente inferior nas amostras contaminadas quando comparadas com o controle para os dias 7, 35 e 42, pelo que a aplicação de NaCl influenciou negativamente o teor de Mg nas folhas. Higbie *et al.* (2010) verificaram em genótipos de algodão, que a adição de NaCl (200 mM) levou a um decréscimo do teor de Mg. Yousif *et al.* (2010) observaram um decréscimo significativo do teor de Mg em plantas de espinafre da Nova Zelândia contaminadas com 50 mM de NaCl, 21 dias após o início do tratamento.

O teor de Ca foi significativamente inferior nas amostras controle para o dia 14, contudo a partir do dia 35 as amostras contaminadas apresentaram um teor de Ca significativamente inferior quando comparadas com o controle, pelo que a aplicação de NaCl afetou negativamente o teor de Ca. Higbie *et al.* (2010) verificaram em genótipos de algodão, que a adição de NaCl (200 mM) não afetou o teor de Ca de um modo geral. Já Yousif *et al.* (2010) verificaram um decréscimo significativo do teor de Ca em plantas de espinafre da Nova Zelândia contaminadas com 50 mM de NaCl, 21 dias após o início do tratamento.

Tal como foi referido anteriormente, os iões de sódio podem interferir com os locais catiónicos envolvidos na ligação de Mg^{2+} e Ca^{2+} .

O teor de Zn foi sempre superior nas amostras contaminadas e à exceção do dia 14, o teor de Zn foi sempre significativamente inferior nas amostras controle quando comparadas com as contaminadas. A aplicação de NaCl levou desta forma a um aumento do teor de Zn. Higbie *et al.* (2010) verificaram em genótipos de algodão, que a adição de NaCl (200 mM) levou a um aumento no teor de Zn.

O teor de Mn foi significativamente inferior nas amostras contaminadas quando comparadas com o controle para os dias 7, 14, 28 e 35. Desta forma a exposição ao NaCl afetou negativamente o teor de Mn. Já Higbie *et al.* (2010) verificaram em genótipos de algodão, que a adição de NaCl (200 mM) levou a um aumento no teor de Mn.

O teor de Fe foi sempre inferior nas amostras contaminadas e com a exceção do dia 14, foi significativamente inferior nas amostras contaminadas quando comparadas com as amostras controle. Pelo que a aplicação de NaCl afetou negativamente o teor de Fe. Higbie *et al.* (2010) verificaram em genótipos de algodão, que a adição de NaCl (200 mM) levou a um decréscimo do teor de Fe.

À exceção do dia 35, o teor de Cu foi significativamente inferior nas amostras controlo quando comparado com as amostras contaminadas. Higbie *et al.* (2010) verificaram em genótipos de algodão, que a adição de NaCl (200 mM) levou a um decréscimo do teor de Cu.

5. CONCLUSÕES

A presença de Cd, As e Mn não influenciou a taxa de germinação, ao contrário do que se verificou no caso dos ensaios com Cu, Zn e NaCl. Em todos os ensaios de germinação, a presença dos PTE e NaCl afetou a biomassa e o índice de tolerância das plântulas, sendo estas menos tolerantes ao Cd e As, como seria de esperar dado que são elementos tóxicos. Apresentaram uma elevada tolerância ao Cu, e também para o Mn e Zn, o que é explicado pelo facto de serem micronutrientes essenciais, induzindo efeitos tóxicos apenas para concentrações mais elevadas. As plântulas manifestaram maior tolerância ao Mn, e os efeitos tóxicos manifestaram-se apenas para concentrações bastante elevadas, a partir de 350 μM .

Pelos ensaios de rega verificou-se que a presença de As e Cu não teve influência no número de folhas, ao contrário do que se verificou na presença de Cd e NaCl. A aplicação de todos os PTE e de NaCl afetou negativamente a biomassa das plantas. O teor de clorofila foi afetado negativamente nas plantas contaminadas em todos os ensaios, quando comparadas com as plantas controlo. Desta forma os PTE e NaCl afetaram o aparelho fotossintético, apesar das plantas contaminadas com PTE continuarem com um aspeto saudável. Apenas nas folhas contaminadas com NaCl algumas folhas murcharam. A presença de NaCl conduziu a um aumento no teor de matéria seca, verificando-se assim que o NaCl afetou a capacidade de absorção de água pelas plantas. A alface demonstra uma sensibilidade elevada à salinidade.

A concentração máxima de Cd acumulada nas folhas de alface foi de 0,40 mg kg^{-1} MF no dia 42, sendo superior ao valor estabelecido por lei para produtos hortícolas de folha (0,2 mg kg^{-1} de peso fresco). A concentração máxima de As nas folhas de alface foi de 0,91 mg kg^{-1} MF no dia 35, sendo superior ao valor estabelecido por lei para produtos alimentares (0,01* mg kg^{-1} de peso fresco). Isto poderá constituir um perigo para a saúde humana, pois para além disso as plantas apresentaram um aspeto saudável. Estes elevados teores de Cd e As comprovam a elevada capacidade que a alface tem em absorver e transportar Cd e As para a parte aérea, pelo que podemos considera-la como uma planta acumuladora de Cd, tal como Mendes & Oliveira, 2004 referem e propícia à acumulação de As, como Bunzl *et al.*, 2001 mencionam. Já a concentração máxima de Cu nas folhas de alface foi de 2,19 mg kg^{-1} PF no dia 42, sendo inferior ao valor máximo estabelecido por lei para alfaces (100 mg kg^{-1} de peso fresco).

Pela avaliação do teor mineral, o Cd absorvido aparenta estimular a absorção de Ca e a reduzir a absorção de Na, K, Mg, Zn, Mn, Fe e Cu. No ensaio com As, este elemento aparenta estimular a absorção de Na e Fe e a reduzir a absorção de K, Mg, Ca, Zn e Mn. No ensaio com Cu, este elemento aparenta estimular a absorção de Mn e a reduzir a absorção de Zn e Fe. No ensaio com NaCl, este contaminante aparenta estimular a absorção de Zn e Cu e a reduzir a absorção de Ca, Mg, Mn e Fe. Desta forma, a presença dos PTE e NaCl afetou o valor nutritivo da alface.

É importante salientar mais uma vez que as alfaces mesmo expostas a concentrações elevadas de PTE, onde as concentrações de Cd e As foram superiores às previstas pela lei, apresentaram um aspeto saudável, como se verificou pela cor verde, apesar do índice *Hansatech* diminuir significativamente não havendo razões aparentes para serem rejeitadas pelo consumidor, que por sua vez ao consumi-las poderá estar a causar danos na sua saúde. Desta forma torna-se fulcral haver um apertado controlo desde o campo, para evitar que estes contaminantes entrem na planta e desta forma na cadeia alimentar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedin, M.J. & Meharg A.A. 2002. Relative toxicity of arsenite and arsenate on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil* 243: 57-66.
- Ahmad, P.; Sarwat, M. & Sharma, S. 2008. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants. *Journal of Plant Biology* 51 (3): 167-173.
- Ahsan, N.; Lee, D.G.; Lee, S.H.; Kang, K.Y.; Lee, J.J.; Kim, P.J.; Yoon, H.S.; Kim, J.S.; Lee, B.H. 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67: 1182-1193.
- Almeida, D. 2006. Manual de Culturas Hortícolas - Volume I. 1ª Edição. Editorial Presença, Lisboa. 346 p.
- Apel, K. & Hirt, H. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Arya, S.K.; Roy, B.K. 2011. Manganese induced changes in growth, chlorophyll content and antioxidants activity in seedlings of broad bean (*Vicia faba* L.). *J. Environ Biol.* 32 (6): 707-711.
- Asada, K. 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 355: 1419-1431.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391-396.
- Atiş, İ. 2011. Effects of salt stress on germination and seedling growth of some sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) cultivars. *Journal Ziraat Fakültesi Dergisi - Süleyman Demirel Üniversitesi* Vol. 6 No. 2 pp. 58-67.
- Azevedo, H.M.O. 1995. Absorção e Acumulação de Cádmio em Três Cultivares de *Lactuca sativa* L. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Nutrição Vegetal, Fertilidade dos Solos e Fertilização. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.
- Benavides, M.P.; Gallego, S.M.; Tomaro, M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Plant Physiol* 17 (1): 21-34.
- Bunzl, K.; Trautmannsheimer, M.; Schramel, P.; Reifenhäuser, W. 2001. Availability of Arsenic, Copper, Lead, Thallium, and Zinc to Various Vegetables Grown in Slag Contaminated Soils. *Journal of Environmental Quality* 30: 934-939.

Calle, M.B.; Emteborg, H.; Linsinger, T.P.J.; Montoro, R.; Sloth, J.J.; Rubio, R.; Baxter, M.J.; Feldmann, J.; Vermaercke, P.; Raber, G. 2011. Does the determination of inorganic arsenic in rice depend on the method?. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 30, No. 4. 641-651.

Chardonens, A. N.; Koefoets, P. L. M.; Zanten, A.; Schat, H. & Verkleij, J. A. C. 1999. Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol* 120: 779-785.

Chaves, M.M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103: 551-560.

Clemens, S.; Palmgren, M.G. & Krämer, U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7: 309-315.

Corrêa, A.X.R.; Rörig, L. R.; Verdinelli, M.A.; Cotellet, S.; Féraud, J.F.; Radetski, C.M. 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. *Science of the Total Environment* 357: 120-127.

Demiral, T. & Turkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 53(3): 247-257.

di Salvatore, M.; Carafa, A.M.; Carratù, G. 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere* 73: 1461-1464.

di Toppi, S. & Gabbriellini, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.

Dixit, V.; Pandey, V.; Shyam, R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Environmental and Experimental Botany* 52 (358): 1101-1109.

Ducic, T. & Polle, A. 2005. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 103-112.

Duffus, J.H. 2002. Heavy Metal, IUPAC, *Pure Appl. Chem.* 74(5): 793-807.

FAO/WHO Codex Alimentarius Commission; 31 Session Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 1999.

Ferreira, V.N.O. 2006. Estudo do stress oxidativo induzido por arsénio em *Lupinus albus* L. na presença e ausência de fósforo- Relatório do Trabalho de Fim de Curso em Eng. Agrónoma. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Gechev, T. S. & Breusegem, F. V. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28: 1091-1101.

Gilbert, P.A.; Heiser, G. 2005. Salt and health: the CASH and BPA perspective. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 30: 62–69

Gomes, C.J. 1998. Estudo do Efeito do Cádmio no Desenvolvimento de Algumas Espécies Vegetais. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Gonçalves, I.M. 2000. Fundo Geoquímico, Poluição e Comportamento do Antmónio, Cádmio, Chumbo, Crómio, Estanho e Zinco em Fluvissolos - Relatório Final de Curso de Engenharia Agronómica. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Gräfe, M. 2000. Arsenic Adsorption on Iron Oxides in the Presence of Soluble Organic Carbon and the Influence of Arsenic on Radish and Lettuce Plant Development. Thesis submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Soil Chemistry.

Higbie, S.M.; Wang, F.; Stewart, J. McD.; Sterling, T.M.; Lindemann, W.C.; Hughs, E.; Zhang, J. 2010. Physiological Response to Salt (NaCl) Stress in Selected Cultivated Tetraploid Cottons. *International Journal of Agronomy*. 12 pp.

Gratão, P.L.; Polle, A.; Lea, P.J.; Azevedo, R.A. 2005. Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32: 481-494.

Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53 (366): 1-11.

Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.

Huang, Y.; Zhang, G.; Wu, F.; Chen, J.; Zhou, M. 2006. Differences in Physiological Traits Among Salt-Stressed Barley Genotypes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37: 557–570.

Lavres Junior, J; Packer, R.M.; Nogueira, N.L.; Moraes, M.F.; Abreu Junior, C.H.; Cabral, C.P.; Rossi, M.L.; Malavolta, E. 2008. Influência do cádmio na produção de massa fresca e nos valores SPAD de dez cultivares de alface em condições de hidroponia. *FerBio2008-Desafios para o uso do solo com eficiência e qualidade ambiental*. Londrina-PR: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Vol.1, p.1-5.

Keshavarzi, M.H.B. 2012. Studying the effects of different levels of salinity which caused by NaCl on early growth and germination of *Lactuca Sativa* L. seedling. *J. stress physiol. biochem.* 8(1): 203-208.

- Li, W.; Khan, M.A.; Yamaguchi, S.; Kamiya, Y. 2005. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 46: 45-50.
- Mahmood, S.; Hussain, A.; Saeed, Z.; Athar, M. 2005. Germination and seedling growth of corn (*Zea mays* L.) under varying levels of copper and zinc. *Int. J. Environ. Sci. Tech. Autumn*. Vol. 2, No. 3, pp. 269-274.
- Mahmood, T.; Islam, K.R.; Muhammad, S. 2007. Toxic effects of heavy metals on early growth and tolerance of cereal crops. *Pak. J. Bot.*, 39(2): 451-462.
- Mann, E.N.; Resende, P. M.; Mann, R.S.; Carvalho, J.G.; Pinho, E.V.R.V. 2002. Efeito da aplicação de manganês no rendimento e na qualidade de sementes de soja. *Pesq. Agropec.*, Brasília, v.37, 12: 1757-1764.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2^o Edição. Academic Press, London.
- Martins, L.L. & Mourato, M.P. 2006. Effect of Excess Copper on Tomato Plants: Growth Parameters, Enzyme Activities, Chlorophyll, and Mineral Content. *Journal of Plant Nutrition* 29: 2179-2198.
- Martins, L.L. & Mourato, M.P. 2008. Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. *Revista Agros*.
- Martins, L.L.; Mourato, M.P.; Cardoso, A.I.; Pinto, A.P.; Mota, A.M.; Gonçalves, M.L.S.; Varennes, A. 2011. Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiol Plant*.
- Meharg, A.A.; Hartley-Whitaker, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and non-resistant plant species. *New Phytologist* 154: 29-43.
- Mendes, B. & Oliveira, J.F.S. 2004. *Qualidade da água para consumo humano*. Lidel (Ed.). Lousã.
- Mengel, K. & Kirkby, E.A. 2001. *Principles of plant nutrition*. 5^a Edição. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 593 p.
- Mithofer, A.; Schulze, B.; Boland, W. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* 566: 1-5.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7 (9): 405-410.
- Møller, I. M.; Jensen, P.E. & Hansson, A. 2007. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. Review. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.

Mourato, M.P.; Martins, L.L.; Campos-Andrada, M.P. 2009a. Physiological responses of *Lupinus luteus* to different copper concentrations. *Biologia Plantarum* 53 (1): 105-111.

Mourato, M.P.; Martins, L.L.; Cuypers, A. 2009b. Effect of Copper on Antioxidant Enzyme Activities and Mineral Nutrition of White Lupin Plants Grown in Nutrient Solution. *Journal of Plant Nutrition* 32 (11):1882-1900.

Navrot, N.; Rouhier, N.; Gelhaye, E. & Jacquot, J. P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129: 185-195.

Nogueira, N.L.; Rossi, M.L.; Packer, R. M.; Souza, E. H.; Lavres, J. Jr. 2011. Response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in nutrient solution contaminated with to cadmium. Center of Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, Av. Centenário, 303,13416-000. Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Päivöke, A.E.A.; Simola, L.K.2001. Arsenate Toxicity to *Pisum sativum*: Mineral Nutrients,Chlorophyll Content, and Phytase Activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 111-121.

Palma, J.M.; Sandalio, L.M.; Corpas, F.J.; Romero-Puertas, M.C.; McCarthy, I.; Río, L.A. 2002. Plant proteases, protein degradations, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 521-530.

Pinto, A.P.; Alves, A.S.; Candeias, A.J.; Cardoso, A.I.; Varennes, A.; Martins, L.L.; Mourato, M.P.; Gonçalves, M.L.S.; Mota, A.M. 2009. Cadmium accumulation and antioxidative defences in *Brassica juncea* L. Czern, *Nicotiana tabacum* L. and *Solanum nigrum* L. Taylor & Francis. *Internationals Journal Environmental Anal. Chemistry*.

Pinto, F. R. 2011. Avaliação da Resposta ao Stresse Oxidativo Induzido por Cádmiio em Plantas de Espinafre (*Spinacea oleracea* L.). Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Ramos, I.; Esteban, E.; Lucena, J.J.; Gárate, A. 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. *Plant Science* 162: 761-767.

Regulamento (CE) N.º 149/2008 da comissão de 29 de Janeiro de 2008 que altera o Regulamento (CE) n.o 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho ao criar os anexos II, III e IV que fixam limites máximos de resíduos para os produtos abrangidos pelo anexo I do mesmo regulamento.

Regulamento (CE) N.º 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Fevereiro de 2005 relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal, e que altera a Diretiva 91/414/CEE do Conselho.

Regulamento (CE) N.º 466/2001 da Comissão de 8 de Março de 2001 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.

Reichman, S. M. 2002. The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc, ed. A. M. E. E. Foundation, 54.

Sandalio, L. M.; Dalurzo, H. C.; Gomez, M.; Romero-Puertas, M. C.; del Rio, L. A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 2115-2126.

Scandalios, J. G. 2002. The Rise of ROS. Elsevier.

Schutzendubel A.; Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351–1365.

Shaibur, M.R.; Kawai, S.2010. Effect of Arsenic on Nutritional Composition of Japanese Mustard Spinach: An III Effect of Arsenic on Nutritional Quality of a Green Leafy Vegetable. *Nature and Science* 8 (8).

Shaibur, M.R.; Kitajima, N.; Sugawara, R.; Kondo, T.; Huq, S.M.I.; Kawai, S. 2006. Physiological and mineralogical properties of arsenic-induced chlorosis in rice seedlings grown hydroponically. *Soil Science and Plant Nutrition* 52: 691–700.

Silva, H. C. D. 2006. Determinação do teor de metais pesados em produtos vegetais frescos - Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Eng. Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Sims, D.A. & Gamon, J.A. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81: 337-354.

Singh, N.; Ma, L.Q. 2006. Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis* L. *Environmental Pollution*. Elsevier. 141(2): 238-246.

Sousa, C. M.M. 1995. Avaliação da tolerância ao cobre de diferentes espécies vegetais- Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Eng. Agronómica. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Stoeva, N.; Berova, M.; Zlatev, Z. 2003. Physiological response of maize to arsenic contamination. *Biologia Plantarum* 47:449-452.

Stoeva, N.; Bineva, T. 2003. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in ascontaminated soil.*Bulgarian Journal of Plant Physiology* 29:87-95.

Tesi, R.; Lenzi, A.; Lombardi, P. (2003). Effect of salinity and oxygen level on lettuce grown in a floating system. *Acta Horticulturae*, 2: 383-387.

Tobe, K.; Li, X.; Omasa, K. 2000. Seed germination and radicle growth of a halophyte, *Kalidium capsicum* (Chenopodiaceae). *Ann.of Botany*, 85, n.3, p.391-396.

Vangronsveld, J. & Clijsters, H. 1994. Toxic effects of metals. In *Plants and the chemical elements. Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.

Varenes, A. de. 2003. *Produtividade dos Solos e Ambiente*. Escolar Editora. Lisboa. 490 p.

Wang, J.; Evangelou, B. P.; Nielsen, M. T. 1992. Surface chemical properties of purified root cell walls from two tobacco genotypes exhibiting different tolerance to manganese toxicity. *Plant Physiol.* 100: 496-501.

Yousif, B.S.; Nguyen, N.T.; Fukuda, Y.; Hakata, H.; Okamoto, Y.; Masaoka, Y.; Saneoka, H. 2010. Effect of Salinity on Growth, Mineral Composition, Photosynthesis and Water Relations of Two Vegetable Crops; New Zealand Spinach (*Tetragonia tetragonioides*) and Water Spinach (*Ipomoea aquatica*). *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 12, No. 2, p.211-216.

Zornoza, P.; Vázquez, S.; Esteban, E.; Fernández-Pascual, M.; Carpena, R. 2002. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 1003–1009.

ANEXOS

Quadro A 1 - Índice de tolerância das plantas de alface para diferentes concentrações de PTE (Cd, As, Cu, Mn, Zn) (μM).

Índice de tolerância					
[PTE] (μM)	Cd	As	Cu	Mn	Zn
0	1,00 \pm 0,15 a A	1,00 \pm 0,04 a A	1,00 \pm 0,24 a A	1,00 \pm 0,11 a A	1,00 \pm 0,10 a A
5	0,98 \pm 0,23 a A	0,81 \pm 0,06 b A	1,33 \pm 0,09 b B	1,02 \pm 0,07 a A	1,02 \pm 0,11 a A
10	0,89 \pm 0,16 ab AC	0,75 \pm 0,03 b A	1,45 \pm 0,17 b B	1,02 \pm 0,13 a C	1,08 \pm 0,08 a C
25	0,71 \pm 0,13 b A	0,66 \pm 0,08 c A	1,36 \pm 0,12 b B	1,03 \pm 0,06 a C	1,00 \pm 0,16 a C
50	0,47 \pm 0,10 c A	0,65 \pm 0,02 c B	1,30 \pm 0,07 b C	0,97 \pm 0,07 ab D	0,92 \pm 0,07 ab D
100	0,33 \pm 0,04 cd A	0,62 \pm 0,02 c B	1,28 \pm 0,07 b C	0,97 \pm 0,02 ab D	0,84 \pm 0,06 bc E
150	0,30 \pm 0,08 cd A	0,33 \pm 0,05 d A	1,22 \pm 0,05 ab B	0,93 \pm 0,03 ab C	0,76 \pm 0,04 bcd D
250	0,28 \pm 0,03 cd A	0,24 \pm 0,02 e A	1,01 \pm 0,17 a B	0,91 \pm 0,03 ab B	0,67 \pm 0,05 cd C
350	0,25 \pm 0,10 cd A	0,21 \pm 0,02 e A	0,62 \pm 0,10 c B	0,84 \pm 0,05 bc C	0,64 \pm 0,00 de B
500	0,17 \pm 0,02 d A	0,19 \pm 0,02 e A	0,51 \pm 0,04 c B	0,76 \pm 0,04 c C	0,47 \pm 0,02 e B

As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) dos valores do índice de tolerância, para as diferentes concentrações de PTE. As letras maiúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os PTE para uma mesma concentração.

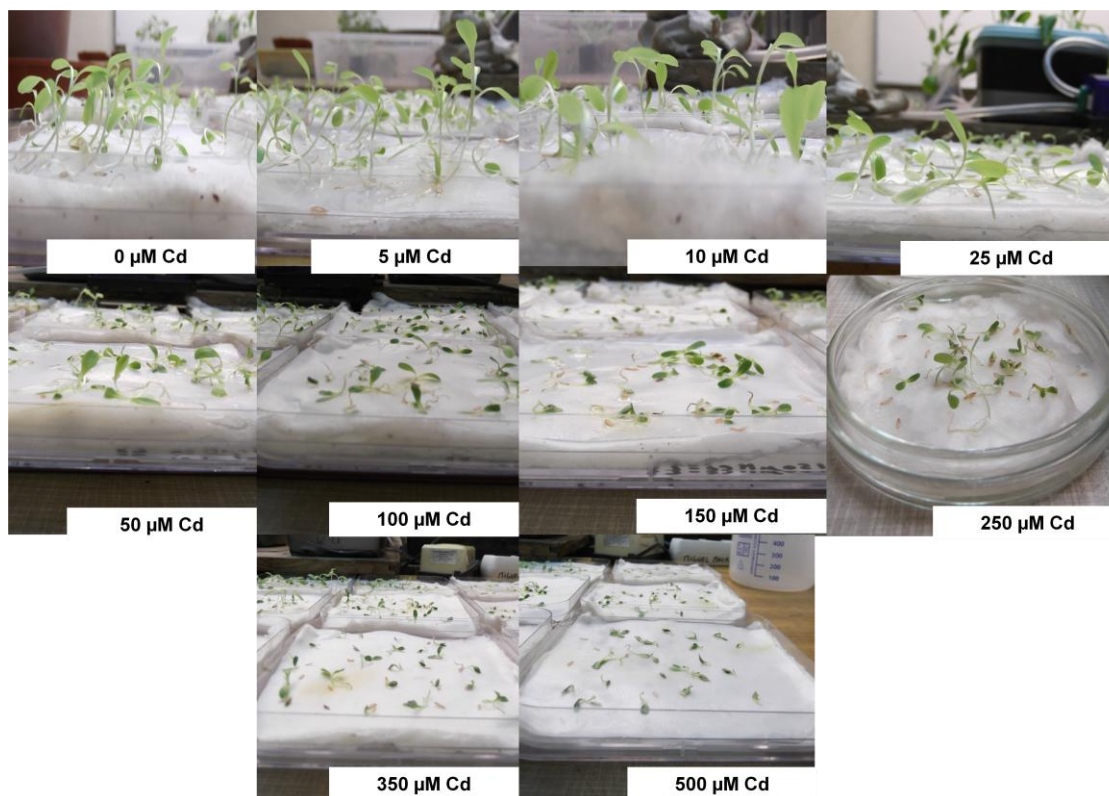


Figura A 1 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de Cd, ao fim de 2 semanas após a germinação.

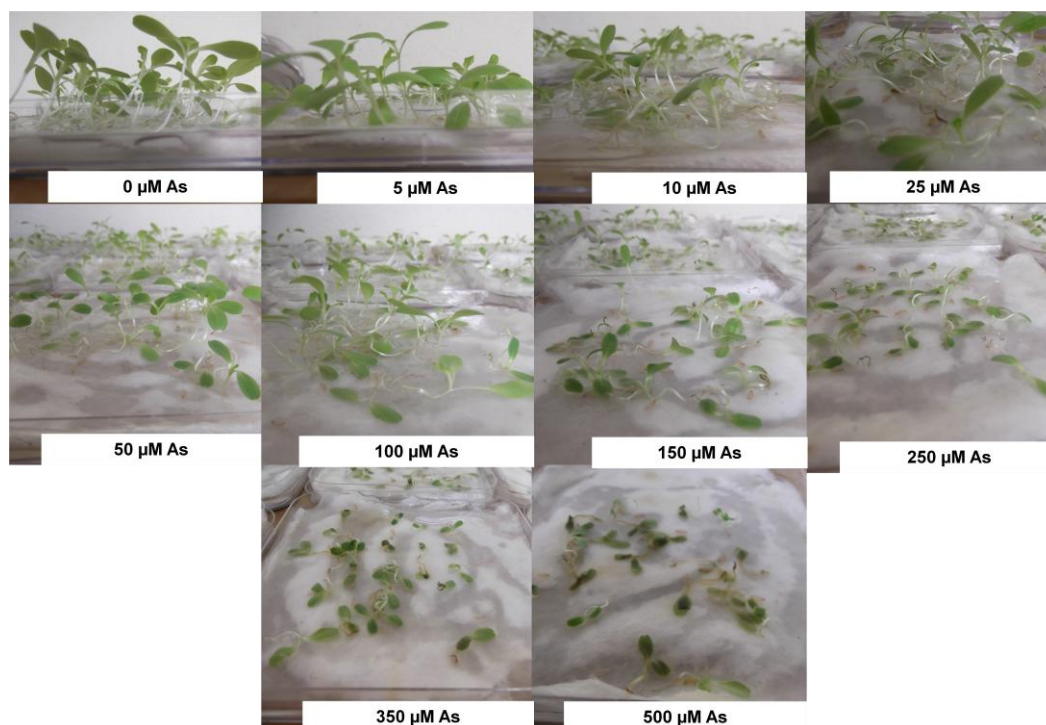


Figura A 2 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de As, ao fim de 2 semanas após a germinação.

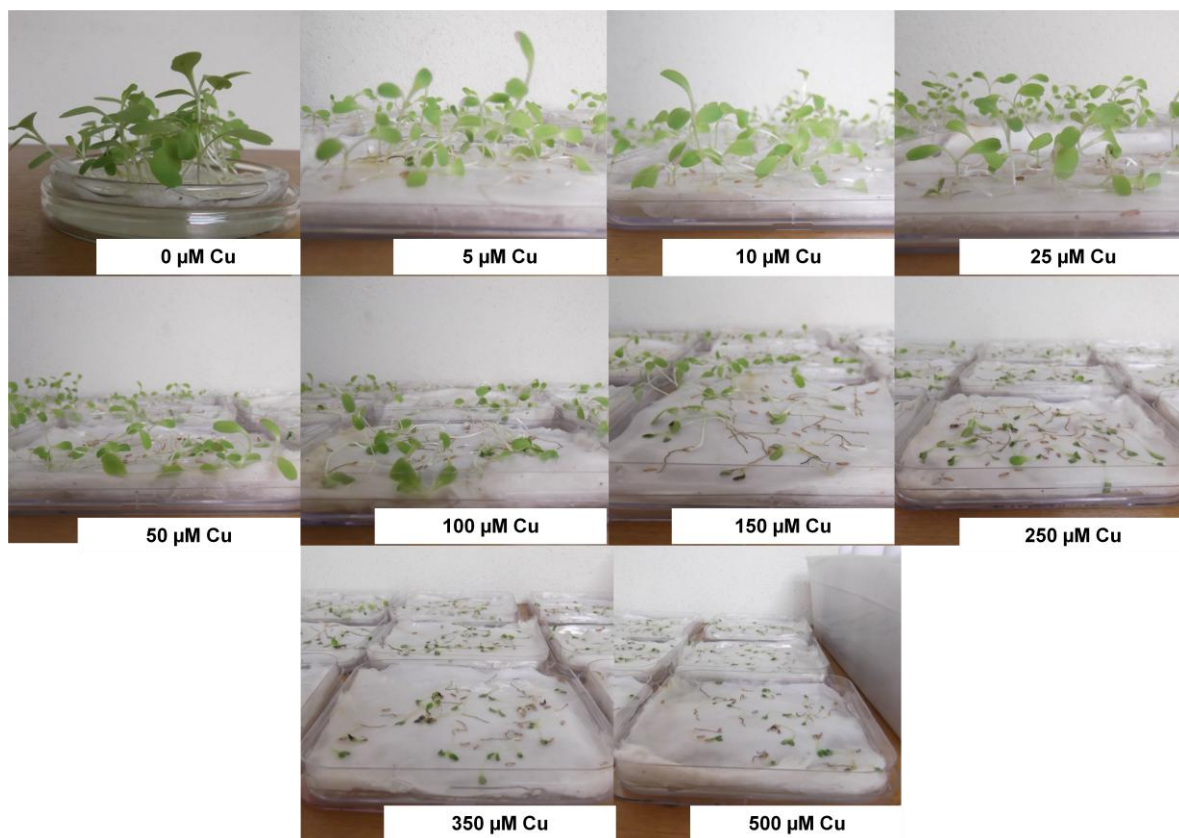


Figura A 3 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de Cu, ao fim de 2 semanas após a germinação.

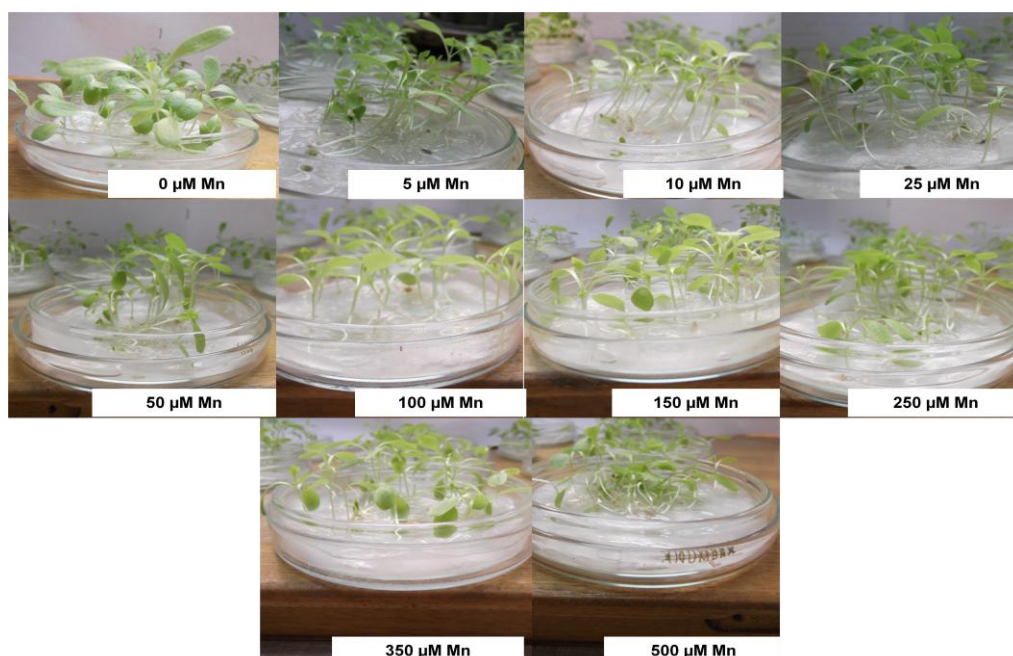


Figura A 4 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de Mn, ao fim de 2 semanas após a germinação.

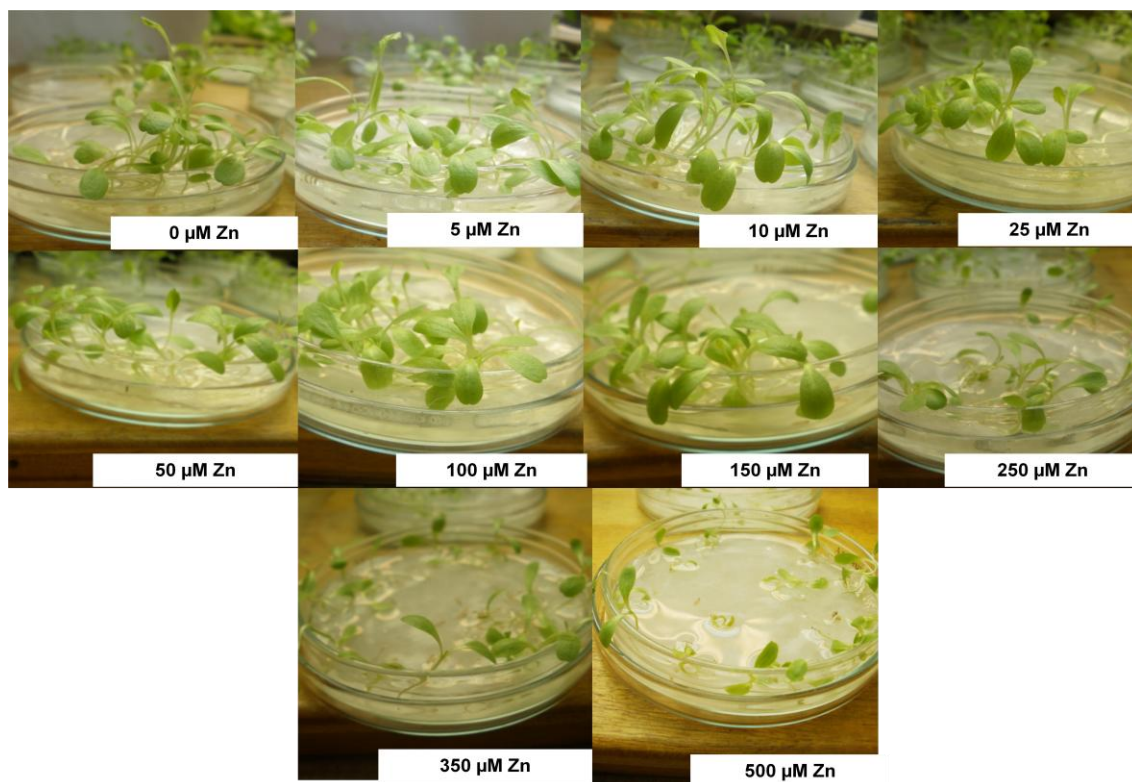


Figura A 5 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de Zn, ao fim de 2 semanas após a germinação.

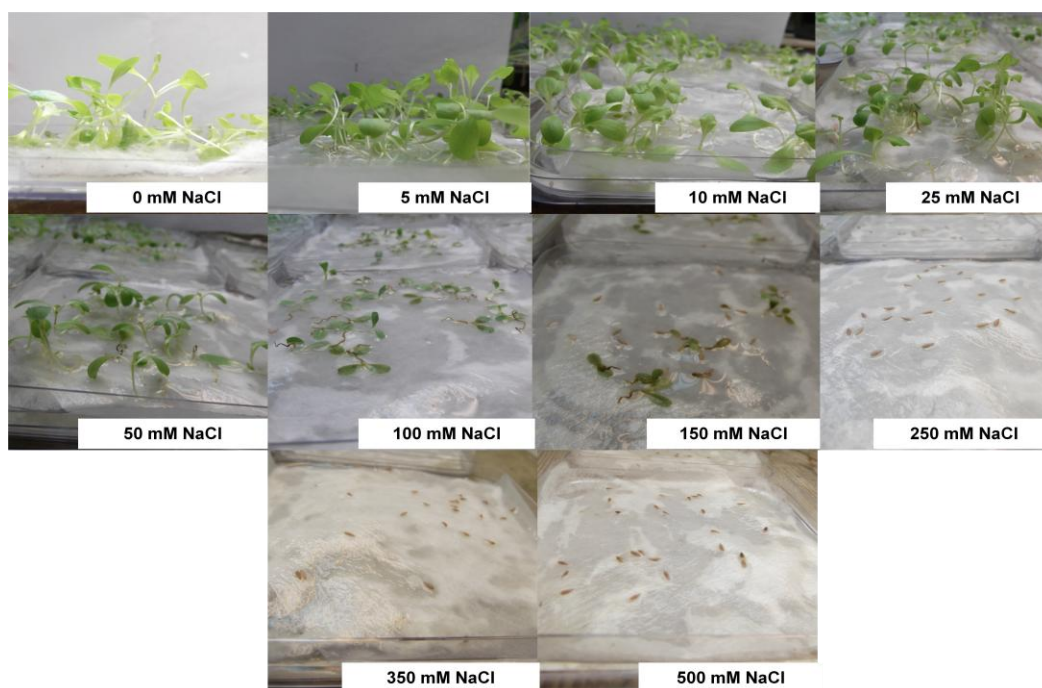







Figura A 6 - Imagens de plantas de alface expostas a diferentes concentrações de NaCl, ao fim de 2 semanas após a germinação.

Controlo	50 μ M de Cd
 <p data-bbox="448 723 523 757">Dia 0</p>	
 <p data-bbox="448 1256 523 1290">Dia 7</p>	 <p data-bbox="1066 1256 1141 1290">Dia 7</p>
 <p data-bbox="440 1715 531 1749">Dia 14</p>	 <p data-bbox="1058 1715 1149 1749">Dia 14</p>

Controlo (continuação)



Dia 21

50 μ M de Cd (continuação)



Dia 21



Dia 28



Dia 28



Dia 35



Dia 35








Controlo (continuação)	50 μ M de Cd (continuação)
 <p data-bbox="443 757 526 786">Dia 42</p>	 <p data-bbox="1059 757 1142 786">Dia 42</p>

Figura A 7 - Imagens de plantas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 μ M Cd recolhidas ao longo do ensaio.

Controlo	50 μ M de As
 <p data-bbox="448 757 520 786">Dia 0</p>	
 <p data-bbox="448 1292 520 1321">Dia 7</p>	 <p data-bbox="1066 1292 1137 1321">Dia 7</p>
 <p data-bbox="440 1827 528 1856">Dia 14</p>	 <p data-bbox="1058 1827 1145 1856">Dia 14</p>

Controlo (continuação)



Dia 21

50 μ M de As (continuação)



Dia 21



Dia 28



Dia 28



Dia 35



Dia 35










Controlo (continuação)	50 μ M de As (continuação)
 <p data-bbox="443 757 526 786">Dia 42</p>	 <p data-bbox="1059 757 1142 786">Dia 42</p>

Figura A 8 - Imagens de plantas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 50 μ M As recolhidas ao longo do ensaio.

Controlo	100 μ M de Cu
 <p data-bbox="448 757 520 786">Dia 0</p>	
 <p data-bbox="448 1292 520 1321">Dia 7</p>	 <p data-bbox="1066 1292 1137 1321">Dia 7</p>
 <p data-bbox="440 1827 529 1856">Dia 14</p>	 <p data-bbox="1054 1827 1144 1856">Dia 14</p>

Controlo (continuação)	100 μ M de Cu (continuação)
 <p data-bbox="443 757 526 790">Dia 21</p>	 <p data-bbox="1059 757 1142 790">Dia 21</p>
 <p data-bbox="443 1292 526 1326">Dia 28</p>	 <p data-bbox="1059 1292 1142 1326">Dia 28</p>
 <p data-bbox="443 1827 526 1861">Dia 35</p>	 <p data-bbox="1059 1827 1142 1861">Dia 35</p>








Controlo (continuação)	100 μ M de Cu (continuação)
 <p data-bbox="443 757 526 786">Dia 42</p>	 <p data-bbox="1059 757 1142 786">Dia 42</p>

Figura A 9 - Imagens de plantas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 100 μ M Cu recolhidas ao longo do ensaio.

Controlo	25 mM de NaCl
 <p data-bbox="448 757 518 786">Dia 0</p>	
 <p data-bbox="448 1294 518 1323">Dia 7</p>	 <p data-bbox="1066 1294 1136 1323">Dia 7</p>
 <p data-bbox="440 1832 526 1861">Dia 14</p>	 <p data-bbox="1058 1832 1144 1861">Dia 14</p>

Controlo (continuação)



Dia 21

25 mM de NaCl (continuação)



Dia 21



Dia 28



Dia 28



Dia 35



Dia 35



Controlo (continuação)	25 mM de NaCl (continuação)
 <p data-bbox="443 757 526 786">Dia 42</p>	 <p data-bbox="1059 757 1142 786">Dia 42</p>

Figura A 10 - Imagens de plantas de alface controlo e contaminadas por rega com solução contendo 25 mM NaCl recolhidas ao longo do ensaio.